

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO DO LEITE
UTILIZANDO GEL POLIMÉRICO TERMOSENSÍVEL
POLI(N-ISOPROPILACRILAMIDA)**

GABRIELA CORDEIRO TAVARES

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTO FERNANDO DE SOUZA FREITAS

BELO HORIZONTE - MG

Maio/2011

GABRIELA CORDEIRO TAVARES

**CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO DO LEITE
UTILIZANDO GEL POLIMÉRICO TERMOSENSÍVEL
POLI(N-ISOPROPILACRILAMIDA)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química – UFMG como
requisito parcial para a obtenção do título
de Mestre em Engenharia Química

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTO FERNANDO DE SOUZA FREITAS

BELO HORIZONTE - MG

Maio/2011

**“CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO DO LEITE
UTILIZANDO GEL POLIMÉRICO TERMOSSENSÍVEL
POLI(N-ISOPROPILACRILAMIDA)”**

GABRIELA CORDEIRO TAVARES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos à obtenção do título de **MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA**.

136^a. DISSERTAÇÃO APROVADA EM 13 DE MAIO DE 2011 POR:

Profa. Judith Pessoa de Andrade Feitosa
Dra. – DQ/UFC

Profa. Tânia Lúcia Santos Miranda
Dra. – DEQ/UFMG

Prof. Roberto Fernando de Souza Freitas
Dr. – Orientador – DEQ/UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que sempre soube colocar os desafios certos no meu caminho para o meu crescimento.

À minha mãe, pelo amor, exemplo de força e dedicação. Ao Savio, por tornar mais feliz e especial cada momento dessa caminhada. À Monique, pelos conselhos, paciência e companhia.

Ao professor e orientador Roberto Freitas, pelos ensinamentos, dedicação e paciência.

À professora Maria Elisa, pela cooperação e apoio que muito contribuíram para o resultado deste trabalho. Ao professor Ricardo e à Cynthia, pelo auxílio no laboratório sempre que precisei. À professora Tânia, pelas sugestões sobre concentração de proteínas que embasaram esta dissertação.

Às amigas do Mestrado Marina, Ana Paula e Márcia, pelo apoio constante e pela troca de idéias. À Leila, que tornou possível as dosagens de proteínas, pelo envolvimento, sugestões e incentivo.

Aos amigos da ANVISA, em especial à Lílian, pela compreensão e incentivo.

À Empresa Sooro, pela doação do soro de leite em pó para a execução do trabalho.

Aos demais amigos do Mestrado, professores, alunos e funcionários do Departamento de Engenharia Química, que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

RESUMO

No presente trabalho, foi feito um estudo da utilização do gel polimérico termossensível poli(N-isopropilacrilamida) para a concentração das proteínas do soro do leite. Para o estudo proposto, foi feita a síntese de uma matriz de géis, variando-se a concentração de monômeros totais e de agente reticulante. Os géis foram caracterizados a partir do seu grau de expansão mássico e através de calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria. Os géis foram utilizados para a concentração de proteínas do soro do leite. Para essa concentração, foram estudadas as seguintes variáveis: concentração de monômeros totais e de reticulante, relação massa de gel / volume de solução de soro de leite e temperatura de concentração. As variáveis-resposta foram o percentual de concentração e a seletividade. Foi feita uma simulação do processo de concentração em ciclos de concentração, em corrente cruzada.

Os géis foram sintetizados por copolimerização por crescimento em cadeia, em solução, via radicais livres, a partir do monômero N-isopropilacrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida como agente reticulante, água como solvente, e persulfato de amônio e metabissulfito de sódio como par redox iniciador. Foi sintetizada uma matriz de onze géis de poli(N-isopropilacrilamida) com diferentes proporções de monômero e de agente reticulante. Todos os géis apresentaram comportamento termodinâmico de solução crítica inferior, com uma transição de fases descontínua em torno de 32°C. Géis com maior concentração de monômeros totais e/ ou com maior concentração de agente reticulante apresentaram um menor grau de expansão mássico, em qualquer temperatura, como resultado do domínio do termo elástico no comportamento termodinâmico.

Os géis caracterizados por calorimetria exploratória diferencial e por termogravimetria apresentaram dois eventos de degradação, um em torno de 300°C e outro em torno de 400°C, o primeiro deles atribuído ao reticulante. As temperaturas de transição vítrea se situaram em torno de 150°C, e foi observado o significativo efeito do reticulante na estrutura dos géis.

O gel 20x5, contactado com soluções de soro de leite, à 5°C e à 20°C, foi capaz de concentrar a solução, em proteínas, em cerca de 10 a 33%, dependendo da relação massa de gel / volume de solução. A eficiência de separação, para os diferentes sistemas estudados, variou entre cerca de 40 e 80%. Os resultados foram discutidos à luz da termodinâmica de géis e através da correlação entre parâmetros de síntese e estrutura do gel obtido. O gel 10x1 mostrou-se incapaz de concentrar a solução de soro de leite.

Os resultados obtidos para a concentração de proteínas do soro do leite, utilizando-se géis poliméricos termossensíveis de poli(N-isopropilacrilamida), mostraram que o Processo Gel pode ser utilizado como uma alternativa vantajosa para tal separação, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental.

Palavras Chave: Géis termossensíveis; Poli(N-isopropilacrilamida); Processos de Concentração; Proteínas do Soro do Leite.

ABSTRACT

In this work, the use of a temperature-sensitive polymer gel, Poly(N-isopropylacrylamide) for the concentration of whey proteins was studied. For the proposed study, a gel matrix was synthesized, by varying the total monomer and the crosslinking agent concentration. The gels were characterized through swelling measurements and by differential scanning calorimetry and thermogravimetry. The gels were used to concentrate whey proteins solutions. For this concentration, the studied variables were: total monomer concentration, crosslinking agent concentration, gel mass / solution volume ratio and concentration temperature. The concentration percentage and the selectivity were determined. A simulation of the concentration process, in concentration cycles, in cross-current operation, was carried out.

The gels were synthesized by chain growth free radical solution copolymerization, with monomer N-isopropylacrylamide, N,N'-methylenebisacrylamide as crosslinking agent, water as solvent, ammonium persulphate and sodium metabissulfite as a redox pair initiator. A gel matrix, consisting of eleven gels, was synthesized, with different concentration of total monomer and crosslinking agent. All obtained gels showed a lower critical solution temperature behavior, with a discontinuous phase transition at around 32°C. Gels with larger concentration of total monomer and/or crosslinking agent showed a lower mass swelling ratio, at all temperatures, as a result of the predominance of the elastic contribution on the thermodynamics behavior.

The gels, characterized by differential scanning calorimetry and by thermogravimetry, showed two separate degradation events, one at around 300°C and the other at around 400°C, the first one attributed to the crosslinking agent. The glass transition temperatures were determined at around 150°C, and the significant effect of the crosslinking agent in the gel structure was observed.

The gel 20x5, contacted with whey proteins solution, at 5°C and at 20°C, was capable of concentrating the solution, in protein, from 10 to 33%, depending on the gel mass / solution volume ratio. The separation efficiencies, for the different studied systems, varied from around 40 to 80%. The results were discussed in the context of gels thermodynamics and through correlations between synthesis parameters and structure of the obtained gels. The 10x1 gel did not concentrate the whey proteins solution.

The obtained results for the concentration of whey proteins solutions, by using temperature-sensitive polymer gel, Poly(N-isopropylacrylamide), showed that the Gel Process can indeed be used as an advantageous alternative for such separation, either from an economic or from an environmental view point.

Keywords: Temperature-sensitive gels; Poly(N-isopropylacrylamide); Concentration Process; Whey Proteins

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 POLÍMEROS	5
2.2 GÉIS POLIMÉRICOS	12
2.3 TERMODINÂMICA DOS GÉIS	14
2.4 GÉIS RESPONSIVOS	16
2.5 APLICAÇÕES DE POLÍMEROS E DE GÉIS POLIMÉRICOS	22
2.5.1 ÁREA MÉDICA.....	22
2.5.2 PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS VIA GEL TERMOSENSÍVEL	26
2.6 GEL POLI(N-ISOPROPILACRILAMIDA)	29
2.7 CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS VIA ANÁLISE TÉRMICA	31
2.7.1 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	32
2.7.2 TERMOGRAVIMETRIA (TG)	33
2.8 SORO DO LEITE	34
2.9 PRODUÇÃO DO SORO	37
2.10 PRINCIPAIS COMPONENTES DO SORO LÁCTEO	46
2.10.1 LACTOSE.....	47
2.10.2 SAIS MINERAIS E VITAMINAS	48
2.10.3 PROTEÍNAS.....	50
2.11 PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS DO SORO E APLICAÇÕES	59
2.12 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE	61
2.12.1 DESNATURAÇÃO TÉRMICA	62
2.12.2 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS	62

2.13	FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE.....	63
CAPÍTULO 3: METODOLOGIA		66
3.1	SÍNTESE DOS GÉIS DE N-ISOPROPILACRILAMIDA.....	66
3.2	MEDIDAS DO GRAU DE EXPANSÃO MÁSSICO	69
3.3	ANÁLISE TÉRMICA.....	70
3.3.1	DETERMINAÇÃO DAS TEMPERATURAS DE TRANSIÇÃO VÍTREA E DE DEGRADAÇÃO VIA CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	71
3.3.2	DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE E DEGRADAÇÃO TÉRMICA VIA TERMOGRAVIMETRIA (TG).....	72
3.4	PREPARAÇÃO DO SORO DO LEITE.....	72
3.5	PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE UTILIZANDO GEL TERMOSENSÍVEL	75
3.5.1	ESTUDO DAS RELAÇÕES MASSA DE GEL/VOLUME DE SORO	75
3.5.2	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA.....	76
3.5.3	ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE SEPARAÇÃO COM A UTILIZAÇÃO DE GÉIS COM DIFERENTES PROPORÇÕES MONÔMERO/RETICULANTE	77
3.5.4	PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO EM CICLOS DE SEPARAÇÃO	77
3.6	DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL.....	78
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO		80
4.1	OBTENÇÃO DOS GÉIS DE POLI(N-ISOPROPILACRILAMIDA).....	80
4.2	MEDIDAS DO GRAU DE EXPANSÃO MÁSSICO	81
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS POR ANÁLISE TÉRMICA	86
4.3.1	DETERMINAÇÃO DAS TEMPERATURAS DE TRANSIÇÃO VÍTREA E DE DEGRADAÇÃO VIA CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	86

4.3.2	DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE E DEGRADAÇÃO TÉRMICA VIA TERMOGRAVIMETRIA (TG).....	89
4.4	CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE.....	92
4.4.1	ESTUDO DAS RELAÇÕES MASSA DE GEL/VOLUME DE SORO	94
4.4.2	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA.....	102
4.4.3	ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE SEPARAÇÃO COM A UTILIZAÇÃO DE GÉIS COM DIFERENTES PROPORÇÕES MONÔMERO/RETICULANTE	104
4.4.4	SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO EM CICLOS DE SEPARAÇÃO.....	104
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES		107
CAPÍTULO 6: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS:.....		111
CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		112
ANEXO I: DADOS RELACIONADOS AO PROCEDIMENTO E À OBTENÇÃO DO GRAU DE EXPANSÃO MÁSSICO.		123
ANEXO II: GRÁFICOS DE EXPANSÃO MÁSSICA DE GÉIS PNIPAAM EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA		124
ANEXO III - DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO LOWRY MODIFICADO.....		130
ANEXO IV - RESULTADOS PARA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS, AUMENTOS DE CONCENTRAÇÃO E EFICIÊNCIAS DE SEPARAÇÃO.....		132

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1 - Síntese de um polímero a partir do seu respectivo monômero – adaptado de MANO & MENDES (2004)

Figura 2-2 – Representação das transições de estado físico de polímeros (SILVA, 2006)

Figura 2-3 – Mecanismo de reação em cadeia via radical livre – adaptado de MANO & MENDES (2004)

Figura 2-4 – Representação do comportamento de expansão e contração do gel poli(N-isopropilacrilamida) 8x1

Figura 2-5 – Diagrama de fases para sistemas com temperatura crítica de solução: (a) LCST e (b) UCST (SILVA, 2006)

Figura 2-6 – Representação esquemática da curva farmacocinética: (a) método tradicional e (b) DDS (SILVA, 2006)

Figura 2-7 – Diagrama do processo de separação via géis termossensíveis (CORREA, 2009)

Figura 2-8 – Fórmula estrutural dos derivados da acrilamida – adaptado de SILVA (2006)

Figura 2-9 – Fórmula estrutural da poli(N- isopropilacrilamida) – adaptado de SILVA (2006)

Figura 2-10 – Fórmulas estruturais: (a) Monômero vinílico N-isopropilacrilamida (NIPAAm) e (b) Monômero divinílico (agente reticulante) N, N'- metilenobisacrilamida (MBAAm) (SILVA FILHO, 2005)

Figura 2-11 – Fluxograma das Etapas do Processamento em Usinas de Leite – adaptado de TECALIM (2009)

Figura 2-12 – Fluxograma simplificado do processo de coagulação enzimática – adaptado de SGARBIERI (2005)

Figura 2-13 – Fluxograma simplificado do processo de Precipitação pela acidificação com ácido orgânico ou mineral – adaptado de SGARBIERI (2005)

Figura 2-14 – Fluxograma simplificado do processo de separação por membranas

Figura 2-15 – Fluxograma simplificado da produção de queijo tipo Mussarela – adaptado de TECALIM (2009)

Figura 2-16 – Fluxograma da produção de soro de queijo em pó – adaptado de ELEGE (2005) *apud* BOSCHI (2006)

Figura 2-17 – Fluxograma de obtenção de lactose bruta em pó

Figura 2-18 – Concentrações médias das proteínas de soro obtidas a partir do leite

Figura 2-19 – Fluxograma de processo em cascata para separação das proteínas dos outros componentes do soro lácteo

Figura 3-1 – Representação esquemática do processo de concentração em ciclos via gel termossensível

Figura 4-1 - Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 20x5 em função da temperatura

Figura 4-2 - Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 10x1 em função da temperatura

Figura 4-3 – Valores de GEM para os géis a diferentes temperaturas

Figura 4-4 – Comportamento de Expansão de Géis PNIPAAm à 5 °C

Figura 4-5 - Curva DSC para determinação da T_g e da T_d do gel 10x1

Figura 4-6 – Curvas DSC para determinação da T_g e da T_d do gel 10x6

Figura 4-7 - Curva DSC para determinação da T_g e da T_d do gel 20x1

Figura 4-8 - Curvas TG/DTG para o gel 10x1 de temperatura ambiente a 600°C

Figura 4-9 - Curvas TG/DTG para o gel 10x6 de temperatura ambiente a 600°C

Figura 4-10 - Curvas TG/DTG para o gel 20x1 de temperatura ambiente a 600°C

Figura 4-11 – Dosagem de Proteína total pelo Método de Lowry Modificado

Figura 4-12 – Resultados da Dosagem de Proteínas pelo Método de Lowry Modificado para a concentração com a utilização do gel 20x5

Figura 4-13 – Resultados da Dosagem de Proteínas pelo Método de Lowry Modificado para o aumento de concentração com a utilização do gel 20x5

Figura 4-14 - Análise da Influência da Massa de Gel na Concentração de Proteínas

Figura 4-15 – Volumes finais das soluções de soro do leite obtidas no processo de concentração de proteínas com a utilização de massas diferentes de gel 20x5 e temperaturas de 5°C e 20°C

Figura 4-16 - Análise da eficiência de separação no processo de concentração de proteínas com a variação da massa de gel 20x5

Figura 4-17 – Análise da influência da temperatura na concentração final de proteínas da solução após uso do gel 20x5

Figura 4-18 - Análise da eficiência de separação no processo de concentração de proteínas com a temperatura

Figura 4-19 – Volumes finais das soluções de soro do leite obtidas no processo de concentração de proteínas com a utilização de massas diferentes de gel 20x5 e temperaturas de 5°C e 20°C

Figura 4-20 – Resultados obtidos a partir de simulação partindo-se de 20 litros de soro e 1 kg de gel seco

Figura 4-21 – Resultados obtidos a partir da simulação partindo-se de 20 litros de soro e 0,5 kg de gel seco

Figura All-1 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 12x1 em função da temperatura

Figura All-2 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 13x1 em função da temperatura

Figura All-3 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 14x1 em função da temperatura

Figura All-4 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 15x1 em função da temperatura

Figura All-5 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 20x1 em função da temperatura

Figura All-6 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 10x1 em função da temperatura

Figura All-7 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 10x2 em função da temperatura

Figura All-8 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 10x4 em função da temperatura

Figura All-9 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 10x5 em função da temperatura

Figura All-10 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 10x6 em função da temperatura

Figura All-11 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 20x5 em função da temperatura

Figura AIII-1 – Curva Analítica para o Padrão de Proteínas

LISTA DE TABELAS

Tabela 2-1 - Tipos de sistemas de liberação controlada de medicamento e seus mecanismos controladores da taxa de liberação – adaptada de SILVA (2006)

Tabela 2-2 – Propriedades analisadas em diferentes técnicas de Análise Térmica (SKOOG et. al, 2001)

Tabela 2-3 – Concentração e massa molecular dos componentes do leite, e distribuição média destes componentes no coalho e no soro – adaptado de MILLER et al. (2000); BRANS et al. (2004) *apud* BALDASSO (2008)

Tabela 2-4 – Composição do leite e dos soros doce e ácido – adaptado de ANTUNES (2003) *apud* BOSCHI (2006)

Tabela 2-5 – Composição aproximada do soro doce – adaptado de MILLER et al. (2000); BYLUND (1995); YADA (2004) *apud* BALDASSO (2008)

Tabela 2-6 – Quantidades médias de vitaminas e minerais em 100 g de soro doce em pó – adaptado de MILLER et al. (2000) *apud* BALDASSO (2008)

Tabela 2-7 – Propriedades e concentração das proteínas do soro – adaptado de MILLER et al. (2000); ZYDNEY (1998) *apud* BALDASSO (2008)

Tabela 3-1 – Reagentes utilizados na síntese de Géis poli(N-isopropilacrilamida)

Tabela 3-2 – Proporções monômero/reticulante e quantidades de iniciador utilizadas na síntese de géis PNIPAAm para 20 mL de solução

Tabela 3-3 – Parâmetros Físico-Químicos do Soro de Leite em Pó - Sooro

Tabela 3-4 – Informações Nutricionais do Soro de Leite em Pó – Sooro

Tabela 3-5 – Parâmetros Microbiológicos do Soro de Leite em Pó – Sooro

Tabela 4-1 - Valores do GEM para os géis em função da temperatura

Tabela 4-2 - Temperaturas de transição vítrea (T_g), de degradação (T_d) e variação de entalpia para dois picos de degradação determinados via DSC para os

Tabela 4-3 – Valores de porcentagem de perda de massa e temperatura máxima de degradação determinados via TG para os géis 10x1, 10x6 e 20x1

Tabela 4-4 – Valores obtidos, média e desvio padrão para a amostra de referência

Tabela 4-5 – Resultados da Dosagem de Proteínas pelo Método de Lowry Modificado para a concentração com a utilização do gel 20x5

Tabela 4-6 – Porcentagem de diferença de concentração de proteínas entre as soluções concentradas e a referência de soro do leite.

Tabela 4-7 - Análise da eficiência de separação no processo de concentração de proteínas com a variação da massa de gel 20x5

Tabela AI-1 - Massa dos géis secos e expandidos a diferentes temperaturas

Tabela AIII-1 - Dados para a construção da Curva Analítica para o Padrão de Proteínas

Tabela AIII-2 - Determinação da absorvância de proteínas das amostras de A a H

Tabela AIII-3 - Determinação da concentração de proteínas nas amostras de A a H a partir dos valores de absorvância

Tabela AIV-1 – Resultados para Concentração de Proteínas

Tabela AIV-2 – Resultados para Aumento de Concentração de Proteínas

Tabela AIV-3 – Resultados para Eficiência de Separação

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura ou Sigla	Descrição
AAm	Acrilamida
ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
Al	Alumínio
AP	Persulfato de Amônio
BCA	Ácido Bicincôninico
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina do Soro Bovino)
C ₃ H ₇	Radical Isopropil
Cd	Cádmio
C _f	Concentração Final
C _i	Concentração Inicial
Cu	Cobre
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DDS	<i>Drug Delivery Systems</i> (Sistema de Liberação Controlada de Medicamentos)
DMA	Análise Termodinâmica
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação)
FSL	Fator Secretor Livre
GEM	Grau de Expansão Mássico
GEV	Grau de Expansão Volumétrico
HEMA	Hidroxietilmetacrilato
Ig	Imunoglobulinas
LCST	<i>Lower Critical Solution Temperature</i> (Temperatura Consoluta Inferior)
MBAAm	Agente Reticulante - N,N'-Metilenobisacrilamida
MF	Microfiltração
M _{GE}	Massa do Gel Expandido
M _{GS}	Massa do Gel Seco
Mn	Manganês
NPN	<i>Nonprotein Nitrogen</i> (Nitrogênio Não Protéico)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PL	Ponto Isoelétrico
PNIPAAm	Poli(N-isopropilacrilamida)
R	Relação massa de gel por volume de soro

Abreviatura ou Sigla	Descrição
SH	Humato de Sódio
SM	Metabissulfito de Sódio
ST	Sólidos Totais
T	Temperatura Absoluta
T_{ambiente}	Temperatura Ambiente
T_d	Temperatura de Degradação
T_f	Temperatura Final
T_g	Temperatura de Transição Vítreá
TG	Termogravimetria
TGA	Análise Termogravimétrica
T_i	Temperatura Inicial
T_m	Temperatura de <i>Melting</i>
TMA	Análise Termomecânica
UF	Ultrafiltração
UHT	<i>Ultra High Temperature</i> (Temperatura Ultra Alta)
UCST	<i>Upper Critical Solution Temperature</i> (Temperatura Consoluta Superior)
UFC	Unidade Formadora de Colônias
V_{GE}	Volume do Gel Expandido
V_{GS}	Volume do Gel Seco
V_{isol}	Volume Inicial da Solução
V_{fsol}	Volume Final da Solução
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)
Zn	Zinco
α -La	α -lactoalbumina
β -Lg	β -lactoglobulina
ΔC	Diferença de Concentração
$\Delta C_{\text{máx}}$	Diferença Máxima de Concentração
ΔG	Energia Livre de Gibbs
ΔG_{el}	Energia de Gibbs - Contribuição Elástica
ΔG_m	Energia de Gibbs - Contribuição de Mistura
ΔH	Varição de Entalpia
ΔS	Varição de Entropia
η	Eficiência de Separação
λ	Comprimento de Onda

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

O leite apresenta-se como uma emulsão líquida em que a fase contínua é formada por água e substâncias hidrossolúveis, enquanto a fase interna, ou descontínua, é formada, principalmente, por micelas de caseína e glóbulos de gordura.

O soro, por sua vez, representa a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação convencional de queijos ou da caseína. A sua composição é basicamente de 94 a 95% de água, 3,8 a 4,2% de lactose, 0,8 a 1,0% de proteínas e 0,7 a 0,8% de minerais. É um subproduto de relevante importância na indústria de laticínios, tendo em vista o volume produzido e sua composição nutricional. No entanto, por décadas, essa parte do leite foi desperdiçada pela indústria de alimentos. Somente a partir da década de 70, pesquisadores passaram a estudar suas propriedades.

Estima-se que a produção mundial de soro de leite seja de 180 a 190 milhões de toneladas por ano. Cerca de metade do soro produzido é eliminada como efluente em sistemas hídricos ou como adubo diretamente no solo, resultando em perda de energia alimentar, e, ao mesmo tempo, em uma grande perda econômica. Quando incorporado às águas residuais dos laticínios, sem tratamento, o soro constitui a principal fonte poluidora do meio ambiente gerada por esse setor; uma vez que a carga poluente, representada pela Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), pode chegar a $60.000 \text{ mg.O}_2\text{.L}^{-1}$. Esse poder poluente é cerca de 100 vezes maior que o de um esgoto doméstico. A outra metade do soro produzido mundialmente é processada em vários produtos alimentícios e farmacêuticos.

O desenvolvimento de novas tecnologias capazes de solucionar o problema do soro do leite, além dos benefícios econômicos e ambientais, pode contribuir para a produção de inovadores medicamentos e alimentos, pois há cada vez mais evidências de que o soro contém uma variedade de compostos capazes de gerar benefícios para a saúde.

Um dos componentes mais valorizados do soro do leite são as proteínas, também conhecidas como “whey proteins”, por suas excelentes propriedades nutritivas, tecnológicas e funcionais. Porém, sua concentração nesse líquido é pequena. Suas propriedades nutritivas derivam da composição em aminoácidos, cujo perfil atende ou supera todas as exigências qualitativas e quantitativas estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde. Dessa forma, pela elevada qualidade protéica, as proteínas do soro podem ser utilizadas para aumentar o valor nutricional dos alimentos usados na dieta humana.

Além das propriedades nutricionais, as proteínas possuem propriedades físico-químicas, que proporcionam características funcionais de grande interesse tecnológico como solubilidade, absorção e retenção de água e de gordura, capacidade emulsificante e estabilidade das emulsões, capacidade espumante e estabilidade de espuma, gelificação, formação de filmes comestíveis e biodegradáveis, formação de micropartículas, melhoria nas propriedades sensoriais e na aceitação dos produtos.

Os processos convencionais disponíveis para concentrar as proteínas do soro do leite, tais como filtração, centrifugação, evaporação, secagem, ultrafiltração, osmose

inversa, tratamento térmico, fermentação, desmineralização e cristalização, são, em geral, caros, demorados e não permitem trabalhar com grandes volumes. Assim, o desenvolvimento de um método de concentração que seja rápido, econômico e que possa ser operado em grande escala é de extrema importância.

O processo proposto neste trabalho baseia-se na utilização de géis poliméricos termossensíveis como solventes extratores. Esses géis têm a propriedade de se expandir em temperaturas baixas, absorvendo água e solutos de baixa massa molecular, enquanto excluem as macromoléculas. Adicionalmente, eles podem ser regenerados por um pequeno aumento na temperatura, que promove uma súbita contração dos mesmos, liberando solvente e solutos absorvidos.

Géis poliméricos têm sido amplamente utilizados em aplicações diversas, especialmente como agentes de separação e dispositivos de liberação controlada de medicamentos. O uso desses géis é diretamente dependente de sua estrutura, obtida a partir da polimerização.

Dentre esses géis, destaca-se o Poli(N-isopropilacrilamida) – PNIPAAm. O gel PNIPAAm é um hidrogel termossensível. Pode ser obtido por copolimerização em solução, via radicais livres, e possui características finais determinadas pelas condições em que a síntese é realizada.

Dentro deste contexto, este trabalho visa desenvolver um procedimento simples para a separação das proteínas do soro do leite, sem alterar a conformação nativa das mesmas, para que, posteriormente, possam ser usadas na produção de dietas

enterais, suplementos esportivos, kit para determinação de massa molecular em laboratórios de diagnóstico, dentre outros produtos. Além disso, ao permitir o reaproveitamento das proteínas do soro do leite, o procedimento contribui para a diminuição da poluição ambiental.

No capítulo 2, é apresentada uma Revisão Bibliográfica incluindo aspectos importantes para o desenvolvimento do trabalho: polímeros; processo gel para concentração de macromoléculas; soro do leite, com enfoque em proteínas do soro; e métodos para obtenção de concentrados protéicos. No capítulo 3 é descrita a metodologia utilizada, de acordo com os objetivos propostos. No capítulo 4, são apresentados os resultados obtidos e é feita a discussão dos mesmos. No capítulo 5, as conclusões obtidas são apresentadas. No capítulo 6 são sugeridas atividades para trabalhos futuros e, no capítulo 7, são relacionadas as referências bibliográficas.

Atualmente, os polímeros apresentam uma vasta gama de possibilidades de utilização, dependendo de suas características físico-químicas. Eles se dividem em naturais e sintéticos. Os exemplos mais conhecidos de polímeros naturais são a borracha natural e a celulose. Já dentre os polímeros artificiais, destacam-se o polietileno, as poliamidas e os poliésteres, que são bastante utilizados na indústria química (GRULKE, 1994).

Quanto à disposição das unidades monoméricas na cadeia polimérica, os polímeros podem ser classificados como homopolímeros ou copolímeros. Os homopolímeros são aqueles que possuem unidades repetitivas semelhantes ao longo de toda cadeia, enquanto os copolímeros são constituídos de duas ou mais unidades monoméricas diferentes na cadeia polimérica (BILLMEYER, 1994).

Para a síntese de um polímero, as unidades monoméricas devem se ligar quimicamente, através de ligações primárias intramoleculares. Já a interação entre cadeias separadas ou segmentos de uma mesma cadeia polimérica é realizada por forças intermoleculares, também chamadas de forças secundárias, tais como ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals.

A disposição estrutural do polímero formado depende da funcionalidade do monômero envolvido na síntese. A funcionalidade é definida como o número de ligações possíveis que um monômero pode formar durante a reação (RODRIGUEZ, 1982).

De acordo com a funcionalidade dos monômeros envolvidos, a cadeia polimérica formada pode ser linear, ramificada ou reticulada. Cadeias lineares são aquelas constituídas apenas por uma cadeia principal contínua, sendo formadas pela polimerização de monômeros bifuncionais. Já as cadeias ramificadas apresentam prolongamentos, longos ou curtos, derivados da cadeia principal. As cadeias reticuladas, por sua vez, apresentam ligações covalentes cruzadas, unindo diferentes cadeias poliméricas, formando uma estrutura em rede tridimensional.

Somente moléculas com funcionalidade igual ou maior que dois são passíveis de serem polimerizadas. Caso a funcionalidade seja maior que dois, podem ocorrer ramificações e reticulações. Polímeros reticulados tendem a gerar redes tridimensionais caso a reticulação seja suficiente para aproximar as moléculas, permitindo que essas se liguem quimicamente por meio de ligações covalentes.

Além disso, os polímeros podem ser classificados de acordo com o arranjo dos monômeros na cadeia. Dessa forma, em relação à configuração dos grupamentos químicos, pode-se dizer que os polímeros se dividem em isotáticos, atáticos e sindiotáticos. Polímeros isotáticos possuem monômeros bastante ordenados ao longo da cadeia. Já os polímeros atáticos são aqueles nos quais os monômeros estão dispostos de maneira aleatória, ou seja, não há seqüência definida de disposição dos diferentes *meros*. Enquanto os polímeros sindiotáticos, por sua vez, apresentam *meros* dispostos de forma alternada ao longo da cadeia (HIEMENZ, 1984).

Outra propriedade de fundamental importância no estudo de polímeros trata-se do comportamento em relação à temperatura. De modo geral, polímeros apresentam

duas temperaturas de transição: temperatura de transição vítrea (T_g) e a temperatura de fusão (T_m). A T_g é definida como sendo a temperatura na qual a mobilidade das cadeias é restringida, durante o resfriamento, devido ao aparecimento de forças intermoleculares. Para temperaturas inferiores à T_g , o polímero se encontra no estado de sólido rígido, no qual as cadeias poliméricas não apresentam mobilidade significativa. Já a T_m é a temperatura a partir da qual as cadeias poliméricas apresentam maior movimentação, sendo capazes de deslizar umas sobre as outras, caracterizando o estado de líquido viscoso. Para temperaturas que se apresentam entre a T_g e a T_m , o polímero se encontra no estado de borracha, apresentando características intermediárias entre líquido viscoso e sólido rígido, conforme se pode observar na Figura 2-2 (SILVA, 2006).

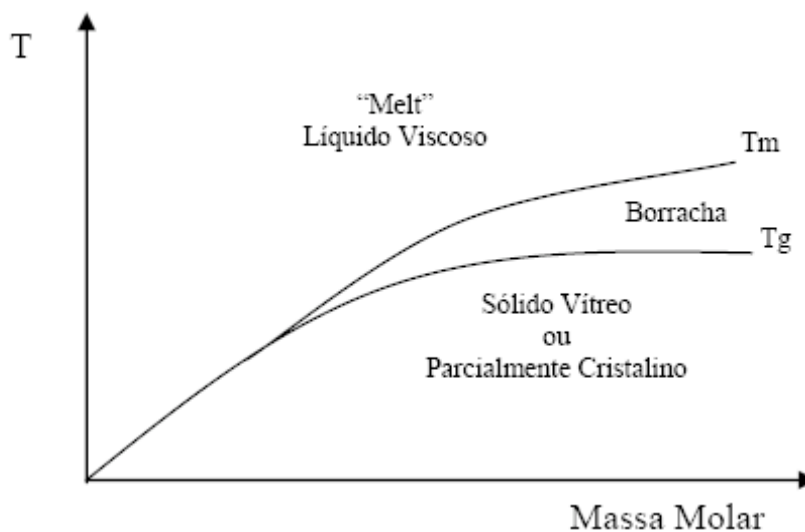


Figura 2-2 – Representação das transições de estado físico de polímeros (SILVA, 2006)

A polimerização é definida como sendo a reação, ou o conjunto de reações, na qual moléculas simples reagem formando um polímero. De acordo com a cinética de reação envolvida, a formação de polímeros pode ocorrer de duas maneiras distintas: crescimento em cadeia ou em etapas.

Durante o processo de formação de polímeros, características fundamentais, como a massa molecular e a distribuição das cadeias, são definidas. Dessa forma, parâmetros que afetam a reação, como pureza dos reagentes, tipo e concentração dos iniciadores, temperatura, pH da solução e tempo da reação, são essenciais na determinação das propriedades finais do polímero formado. Além disso, eventos como reações laterais, transferência de cadeia e formação de ligações cruzadas são também determinantes para as características do produto formado (SILVA FILHO, 2005).

A polimerização por crescimento em cadeia, também chamada de adição, consiste na formação de uma cadeia polimérica completa a partir da desestabilização da insaturação de um monômero e sua sucessiva reação com outras moléculas de monômero. Nesse tipo de polimerização, são formados poucos centros ativos, fazendo com que sejam obtidos polímeros de alta massa molecular, mesmo com uma baixa conversão. Assim, pode ser dividida em três diferentes etapas: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação ocorre a formação do centro ativo, enquanto na propagação a cadeia polimérica cresce até que ocorra o desaparecimento do centro ativo na etapa de terminação (RODRIGUEZ, 1982; SILVA FILHO, 2005). As três etapas constituintes da reação em cadeia apresentam mecanismos e velocidades de reação diferentes (BILLMEYER, 1994). Na Figura 2-3, tem-se uma representação do mecanismo de reação em cadeia, via radicais livres.

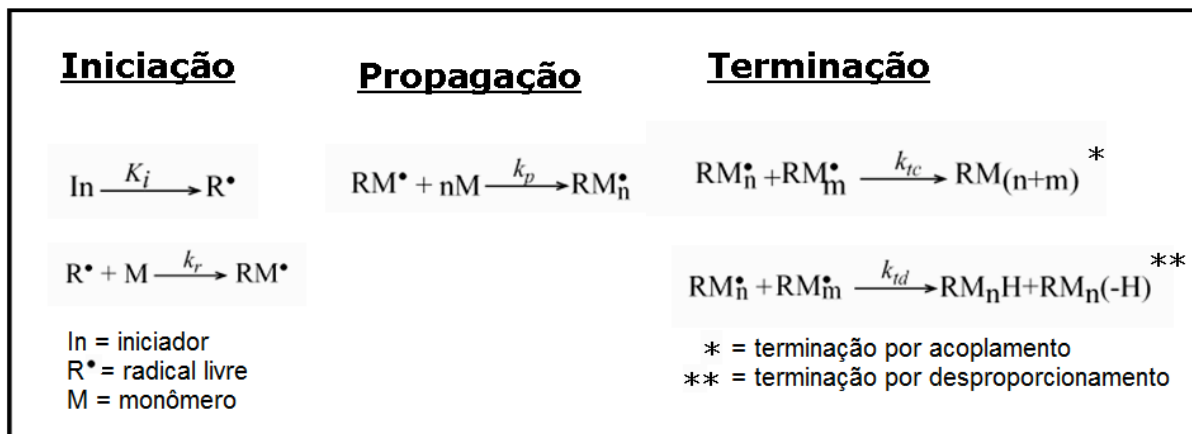


Figura 2-3 – Mecanismo de reação em cadeia via radical livre – adaptado de MANO & MENDES (2004)

Já a polimerização em etapas, também conhecida como condensação, é caracterizada pela presença de uma grande quantidade de centros ativos, acarretando em formação de várias cadeias pequenas. Consiste na sucessiva condensação dos grupos funcionais reativos nos monômeros, através da eliminação de moléculas de baixa massa molecular, como, por exemplo, a água. Assume-se que as espécies reativas presentes no meio reacional apresentam as mesmas reatividades, independentemente da massa molecular, apresentando assim o mesmo mecanismo de reação, o que faz com que todas as espécies sejam capazes de reagir entre si. Assim, devido à existência de vários centros ativos, o monômero é consumido muito rapidamente pelos diferentes centros, fazendo com que altas massas moleculares só sejam obtidas para uma elevada conversão (RODRIGUEZ, 1982; SILVA FILHO, 2005).

Além disso, a polimerização pode ser diferenciada pelo mecanismo. Caso, no mecanismo da reação, ocorra a decomposição do iniciador em radicais livres, diz-se que o mecanismo de polimerização é via radicais livres. No entanto, se o iniciador se

decompõe em íons, o mecanismo é dito via iônica, podendo ser catiônico ou aniônico dependendo do íon diretamente responsável pela polimerização (BILLMEYER, 1994). Tem-se, ainda, a polimerização via catálise Ziegler-Natta, a qual leva à formação de polímeros estereoespecíficos.

Os processos de polimerização podem ser divididos em massa, solução, emulsão e suspensão. Os processos mais difundidos consistem na polimerização em massa e em solução.

A polimerização em massa, também chamada de “bulk”, se baseia apenas no aquecimento do monômero, na presença do iniciador, dentro de um reator, não contando com a adição de solventes. Apesar de apresentar um alto grau de pureza, apresenta um elevado aumento de viscosidade com o decorrer da reação, o que dificulta a movimentação das moléculas dentro do reator. Desse modo, devido ao caráter exotérmico das reações de polimerização, pode ocorrer aumento demasiado da temperatura do reator, causando inclusive a degradação do polímero. Portanto, as reações de polimerização em massa são conduzidas a baixas temperaturas, necessitando de um maior tempo para o término da reação.

No caso da polimerização em solução, o monômero, juntamente com o iniciador e o solvente, é introduzido no reator. O solvente deve ser capaz de dissolver totalmente o monômero envolvido na reação. Devido à presença do solvente no meio reacional, a viscosidade do sistema é menor, o que permite uma maior transferência de calor entre os reagentes e o meio externo. No entanto, o uso de grandes quantidades de solventes, que muitas vezes são tóxicos ou inflamáveis, exige um maior cuidado em

relação à segurança, além de exigir etapas subseqüentes do processo para separar o polímero formado e recuperar o solvente.

2.2 GÉIS POLIMÉRICOS

O gel polimérico pode ser definido como uma rede polimérica, unida por ligações cruzadas, que, quando imersa em solventes compatíveis, se expande e retém o solvente dentro de sua estrutura tridimensional, não se dissolvendo no mesmo, devido à existência de interações intermoleculares e reticulações (SHIBAYAMA & TANAKA, 1993; CUSSLER *et al.*, 1993). Quando o meio de expansão do gel é aquoso, ele é denominado hidrogel (WANG *et al.*, 1993).

Assim, o gel polimérico consiste em uma rede polimérica tridimensional, formada por uma estrutura composta por longas cadeias unidas por ligações cruzadas (SOUSA, 1993). A estrutura do gel varia de acordo com o tamanho de seus poros, podendo ser microreticular ou macroreticular.

Géis com estrutura microreticular apresentam ligações cruzadas distribuídas de maneira homogênea, ao longo da rede tridimensional. Essa estrutura se caracteriza por apresentar poros menores, com um menor grau de expansão no solvente e uma maior densidade de ligações cruzadas, o que confere ao gel uma maior rigidez (SOUSA, 1993).

Já a estrutura macroreticular, apresenta ligações cruzadas distribuídas de uma forma mais heterogênea, com uma menor densidade de ligações. Isso implica em

poros maiores e com uma estrutura mais flexível, conferindo ao gel uma maior capacidade de expansão (SOUSA, 1993).

Uma das mais importantes propriedades dos géis poliméricos é o grau de expansão, uma vez que outras propriedades, como permeabilidade a solutos dissolvidos, cinética de expansão e características mecânicas, são diretamente influenciadas por ele (GEHRKE, 1993; FREITAS & CUSSLER, 1987a; FREITAS & CUSSLER, 1987b; SOUSA, 2006).

O grau de expansão pode ser expresso em termos mássico ou volumétrico. O grau de expansão mássico (GEM) é definido pela razão entre a massa do gel expandido (M_{GE}) e a massa do gel seco (M_{GS}), conforme se pode observar na equação 2.1.

$$GEM = \frac{M_{GE}}{M_{GS}} \quad \text{(equação 2.1)}$$

Já o grau de expansão volumétrico (GEV) é dado pela razão entre o volume do gel expandido (V_{GE}) e o volume do gel seco (V_{GS}), de acordo com a equação 2.2.

$$GEV = \frac{V_{GE}}{V_{GS}} \quad \text{(equação 2.2)}$$

É importante ressaltar que essas medidas devem ser realizadas quando o gel já tiver atingido o equilíbrio termodinâmico com o meio no qual está em contato, de modo que os potenciais químicos do solvente dentro e fora do gel sejam iguais. Ao ter atingido esse estado, o gel não apresenta mais variação de massa e de volume,

caso as condições da vizinhança (temperatura, pH, campo elétrico, solvente) não sejam alteradas

O grau de expansão varia com a estrutura do gel, com o tipo de solvente em contato e com as variáveis do meio em que o gel se encontra. Os géis que sofrem variação no grau de expansão de acordo com variáveis do meio, tais como temperatura, pH e luz, são denominados géis responsivos (DUSEK, 1993).

Quando o gel está em estado expandido, ocorre a formação de interações polímero-solvente preferenciais como, por exemplo, ligações de hidrogênio. No entanto, quando o gel atinge um estágio crítico, caracterizado por uma transição de fases, passa para o estado contraído, havendo o rompimento das ligações polímero-solvente, que são substituídas pelas interações polímero-polímero e solvente-solvente.

2.3 TERMODINÂMICA DOS GÉIS

A termodinâmica de géis descreve o fenômeno de expansão e contração quando um gel polimérico é colocado em contato com um solvente (FREITAS, 1986). A expansão do gel representa a afinidade de sua estrutura química com o solvente, não se dissolvendo nesse, apenas interagindo e o absorvendo. Durante a expansão, o gel tem seu volume aumentado, até que se atinja o equilíbrio, no qual o potencial químico do solvente no gel e na vizinhança se igualam, devido às interações gel-solvente e à elasticidade da rede polimérica. Com a expansão da rede tridimensional

do gel, ocorre o alongamento das cadeias poliméricas, o que gera uma força oposta à expansão (SILVA, 2006).

Do ponto de vista termodinâmico, o comportamento de expansão do gel deve ser analisado em termos da energia livre de Gibbs (ΔG). Já essa variação de energia pode ser visualizada como a soma de dois termos: o termo de mistura (ΔG_m), que está relacionado à interação polímero-solvente, e o termo elástico (ΔG_{el}), decorrente da reação da rede do gel ocasionada pela expansão (SILVA, 2006). Dessa forma, ao atingir o equilíbrio termodinâmico com o solvente, tem-se que a variação de energia livre de Gibbs envolvida nesse processo deve ser nula, conforme equação 2.3.

$$\Delta G = \Delta G_m + \Delta G_{el} = 0 \quad \text{(equação 2.3)}$$

Quando o gel polimérico entra em contato com uma solução compatível, ele absorve solvente e se expande, resultando em uma variação negativa da energia de Gibbs de mistura. No entanto, as tensões geradas devido à expansão da rede polimérica fazem com que a contribuição elástica seja positiva. Dessa forma, o equilíbrio termodinâmico será atingido quando as duas contribuições, que são opostas, se anularem. Por sua vez, quando a contribuição elástica se torna maior do que o termo de mistura, ou seja, quando a força oposta à expansão se tornar maior do que a afinidade com o solvente, a energia de Gibbs se torna positiva, ocasionando a contração do gel e a conseqüente liberação do solvente que estava contido nele.

2.4 GÉIS RESPONSIVOS

Géis responsivos apresentam a capacidade de alterar suas propriedades de forma reversível a partir de um estímulo externo (IRIE, 1993). Entre os estímulos externos mais comuns no estudo de géis responsivos destacam-se temperatura, pH, composição do solvente, tensão mecânica, campo elétrico e luz (DUSEK, 1993).

É importante ressaltar o caráter reversível dessas mudanças, que garante que o gel possa repetir o ciclo expansão-contração uma série de vezes, apresentando um elevado tempo de vida útil. Experiências têm mostrado que a transição de fases do gel, mantendo suas propriedades estáveis, é capaz de ser realizada mais de 500 vezes, para diversos tipos de géis responsivos (GEHRKE, 1993).

Em relação aos tipos de estímulos, os géis podem ser divididos em sensíveis ao pH, sensíveis a luz, sensíveis a meios bioquímicos, sensíveis a outros estímulos e termossensíveis.

Géis sensíveis ao pH são aqueles que apresentam grupos ionizáveis, uma vez que o grau de ionização do gel, e sua conseqüente sensibilidade ao pH, é determinado por esse parâmetro (SHIBAYAMA & TANAKA, 1993). Hidrogéis sensíveis ao pH possuem grupos pendentes ácidos, como ácido carboxílico e ácido sulfônico, ou básicos, como sais de amônio. Esses grupos pendentes podem ser receptores ou doadores de prótons, de acordo com o pH do meio em que estão inseridos (QIU & PARK, 2001 *apud* SILVA, 2006). Géis que sofrem expansão no volume com o aumento do pH são denominados géis polieletrólitos aniônicos, enquanto que aqueles que se expandem com a redução do pH são ditos polieletrólitos catiônicos.

Portanto, a quantidade de grupos ionizáveis do gel determina o grau de expansão em um determinado pH.

Já alguns géis apresentam mudanças em suas propriedades estimuladas pela presença de luz. Esse tipo de sensibilidade se demonstra bastante interessante pelo fato de a luz sobre um gel poder ser colocada ou retirada instantaneamente, além de sua intensidade poder ser facilmente controlada (SILVA, 2006).

Os géis sensíveis a meios bioquímicos são aqueles que apresentam um comportamento de fase diferente frente a um tipo particular de molécula. Quando essas moléculas entram na estrutura do gel, o elemento ativo, presente no interior do gel, as converte em outras moléculas ou formam complexos, que são capazes de perturbar o equilíbrio do gel, ocasionando a expansão ou contração de sua estrutura (SHIBAYAMA & TANAKA, 1993).

Os géis sensíveis a outros estímulos, por sua vez, apresentam diferentes comportamentos de fase frente a campos elétricos, tensões mecânicas, entre outros (SHIBAYAMA & TANAKA, 1993). Como exemplo, pode-se citar a aplicação em liberação controlada de insulina, na qual uma mistura de gel com partículas magnéticas vem sendo usada para liberar continuamente essa substância, quando sujeitos a um campo magnético (KOST & LANGER, 2001).

Um gel é dito termossensível quando suas características de expansão e contração são função da temperatura. De modo geral, esses géis apresentam uma grande variação no grau de expansão volumétrico para variações relativamente pequenas

na temperatura, constituindo a classe de gel mais estudada entre os responsivos (FREITAS, 1986; FREITAS & CUSSLER, 1987a; FREITAS & CUSSLER, 1987b).

A Figura 2-4 mostra o comportamento de expansão e contração do gel poli(N-isopropilacrilamida) 8X1 em água. Nota-se que o sistema apresenta uma mudança abrupta do grau de expansão volumétrica com a temperatura, o que caracteriza um gel termossensível.

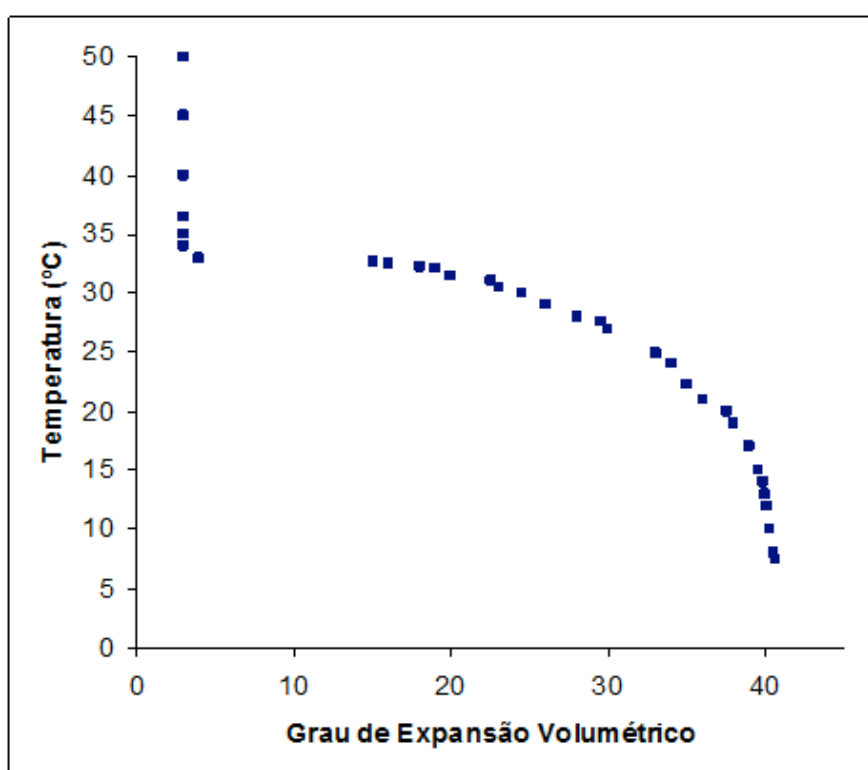


Figura 2-4 – Representação do comportamento de expansão e contração do gel poli(N-isopropilacrilamida) 8x1 (FREITAS E CUSSLER, 1987)

Para que a síntese de um gel termossensível seja possível, é necessário que o monômero ou o agente reticulante apresente solubilidade capaz de variar com a temperatura. Desse modo, buscando uma variação significativa do grau de expansão com a variação de temperatura, um dos componentes do gel deve ser insolúvel acima ou abaixo de um ponto crítico de temperatura. Portanto, o sistema

deve apresentar uma temperatura crítica inferior (LCST – *lower critical solution temperature*) ou superior (UCST – *upper critical solution temperature*) (BROMBERG & RON, 1998), conforme representado na Figura 2-5.

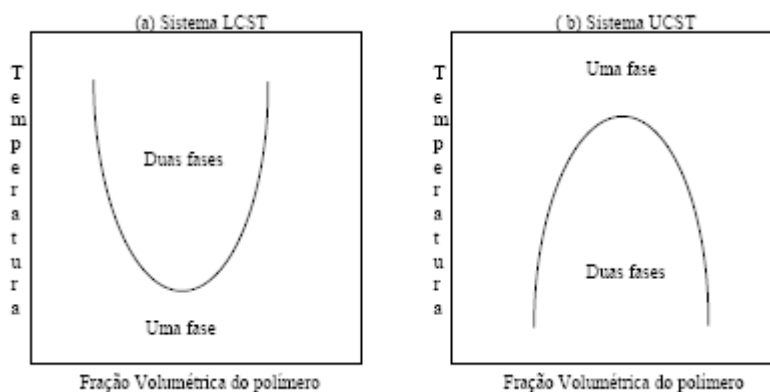


Figura 2-5 – Diagrama de fases para sistemas com temperatura crítica de solução: (a) LCST e (b) UCST (SILVA, 2006)

Os géis que possuem comportamento LCST reduzem o volume com o aumento da temperatura. Em temperaturas inferiores à temperatura crítica inferior, as interações polímero-solvente são favorecidas, de modo que o polímero absorve solvente e se expande, até que o equilíbrio termodinâmico seja atingido. Quando a temperatura é aumentada para valores próximos à temperatura crítica, ocorre uma alteração na conformação das cadeias poliméricas do gel, que passam de um estado solvatado, com dispersão aleatória no solvente, para um estado globular, com maior proximidade entre as cadeias poliméricas (OLIVEIRA, 1992). Nesse estado, o polímero se torna hidrofóbico, sendo rompidas as ligações de hidrogênio entre polímero e solvente, enquanto as interações polímero-polímero e solvente-solvente passam a ser predominantes. Dessa forma, as cadeias poliméricas se atraem, acarretando a contração do polímero e a conseqüente liberação do solvente.

Já os géis que apresentam temperatura crítica superior possuem um comportamento oposto, se contraindo com a redução de temperatura. Abaixo da temperatura crítica, o polímero se comporta como hidrofóbico, não absorvendo água. Já acima dessa temperatura, as cadeias poliméricas interagem com a água, permitindo que essa entre na rede tridimensional do gel, acarretando sua expansão.

Logo, a contração da estrutura polimérica do gel pode ser atribuída à mudança do caráter hidrofílico das cadeias poliméricas quando o sistema atinge a temperatura crítica. Na temperatura crítica, as cadeias se tornam hidrofóbicas, ocorrendo a contração do gel e tornando a separação de fases termodinamicamente favorável ($\Delta G < 0$).

A variação da energia livre de Gibbs é dada pela variação da entalpia menos o produto da temperatura absoluta vezes a variação de entropia do sistema, conforme equação 2.4 (SMITH *et al.*, 1997).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{(equação 2.4)}$$

Para os sistemas LCST, a separação de fases ocorre com o aumento da temperatura, que, por sua vez, aumenta a entalpia e a entropia do sistema. Logo, para que a energia livre seja negativa e, conseqüentemente, a separação de fases seja favorável, a contribuição entrópica deve ser, em módulo, superior ao termo entálpico. Portanto, a separação de fases em sistemas LCST se caracteriza por um comportamento essencialmente entrópico.

Já em sistemas UCST, a separação de fases ocorre com a diminuição da temperatura, que implica numa diminuição da entalpia e da entropia do sistema. Assim, para que a separação de fases seja favorável termodinamicamente, é necessário que o termo entálpico seja maior que a contribuição entrópica, o que demonstra que o comportamento de sistemas com temperatura crítica superior se baseia em um comportamento essencialmente entálpico.

É importante ressaltar que cada sistema gel-solvente apresenta um valor específico de temperatura crítica. O valor da temperatura de transição está diretamente relacionado com a intensidade da interação entre o polímero e o solvente. Uma maior a magnitude de interação, implica em maiores e menores temperaturas críticas para sistemas LCST e UCST, respectivamente.

No entanto, atualmente, existem estudos que visam modificar a temperatura de transição de géis termossensíveis, com o intuito de viabilizar um uso específico.

A presença de eletrólitos na solução é um dos fatores capaz de modificar a temperatura de transição de um sistema gel-solvente. Em soluções salinas, por exemplo, ocorre uma competição entre os eletrólitos e o polímero pela interação com o solvente. Dessa forma, a interação polímero-solvente é desfavorecida, o que contribui para o aumento da intensidade das interações polímero-polímero. Assim, para um sistema LCST, a temperatura de contração do gel diminuirá, sendo menor a temperatura de contração do sistema (FREITAS, 1986).

Outro exemplo de variação da temperatura de transição de polímeros trata-se da copolimerização com polímeros específicos. O uso de comonômeros hidrofílicos, na reação com polímeros de comportamento LCST, aumenta a temperatura crítica, enquanto comonômeros hidrofóbicos causam efeito contrário, diminuindo a temperatura de transição de fases (EECKMAN *et al.*, 2004).

2.5 APLICAÇÕES DE POLÍMEROS E DE GÉIS POLIMÉRICOS

Atualmente, polímeros e géis vêm se destacando no âmbito acadêmico e industrial como uma nova classe de materiais, que apresentam características diferentes dos materiais convencionais. Por apresentarem ampla versatilidade e propriedades diferentes dos materiais comumente usados, polímeros e géis vêm substituindo materiais sólidos e líquidos tradicionais, suprimindo suas limitações.

A possibilidade de absorção de grande quantidade de água, assim como o caráter responsivo dos géis frente às variações do meio em que estão inseridos vêm contribuindo para a utilização dos géis em diversas aplicações, como, por exemplo, em processos de concentração e purificação de soluções de macromoléculas (FREITAS & CUSSLER, 1987b), dispositivos de liberação controlada de medicamentos e usos diversos na área médica (SILVA, 2006). Essas aplicações serão mais bem detalhadas nos subitens subsequentes.

2.5.1 ÁREA MÉDICA

Os polímeros e géis poliméricos apresentam vasta aplicação na medicina, sendo realizados vários estudos que visam encontrar novas aplicações para esses

materiais, assim como otimizar os usos comumente disseminados. Materiais utilizados na área médica são geralmente conhecidos como biomateriais. Como principais aplicações de polímeros em dispositivos médicos e farmacêuticos, destacam-se lentes de contato e materiais para implantes.

Entre as principais propriedades desejadas para o uso de um biopolímero na área médica, destacam-se durabilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. A durabilidade e biocompatibilidade são necessárias para que a aplicação seja confiável, duradoura e não prejudique o organismo, ou seja, não apresente caráter tóxico. Já a biodegradabilidade se torna importante para impedir uma cirurgia posterior para retirar o material, caso esse não fosse capaz de se degradar naturalmente dentro do organismo. Dessa forma, os custos são reduzidos, assim como o risco ao qual o paciente é exposto.

Em relação aos géis poliméricos convencionais, os sintetizados a partir de monômeros como acrilamida (AAm) e hidroxietilmetacrilato (HEMA), vêm se mostrando biocompatíveis e sendo utilizados como curativos para queimaduras e lentes de contato. Além disso, géis também estão sendo estudados para uso como tecidos de implantes animais, que possibilitariam o futuro uso como implantes em humanos (GOMBOTZ & HOFFMAN, 1986).

Já os géis sintetizados a partir da N-isopropilacrilamida estão sendo aplicados na biomedicina como superfície de cultura celular. Quando introduzido em um tecido de cultura, o PNIPAAm tem comportamento diferenciado de acordo com a temperatura do sistema. Caso a temperatura seja superior à temperatura crítica inferior, o gel se

torna hidrofóbico, se aderindo ao substrato e permitindo a proliferação celular. No entanto, caso a temperatura atinja valores inferiores à temperatura crítica inferior, o gel se torna hidrofílico, fazendo com que as células se separem do substrato (KLOUDA & MIKOS, 2008).

O uso de géis poliméricos na liberação controlada de fármacos visa otimizar a forma de administração de novos medicamentos. Por forma de administração, entende-se a forma pela qual a substância é introduzida e liberada no organismo. Mundialmente, os novos meios de administração são conhecidos como sistemas de liberação controlada de medicamentos (DDS – *Drug Delivery Systems*) (SILVA, 2006).

Estes sistemas objetivam a liberação do agente farmacológico de maneira previsível, visando manter um nível constante da substância no organismo. Isso não acontece com os métodos convencionais, como a administração por via oral ou intravenosa, nos quais a concentração do fármaco na corrente sanguínea aumenta quando o medicamento é ingerido, e, após certo tempo, diminui para valores inferiores aos recomendados, sendo necessária uma nova dosagem.

Para valores de concentração superiores a uma concentração máxima, a substância ativa passa a ter efeito tóxico no organismo. Desse modo, pelos métodos tradicionais, com o intuito de manter a concentração da droga entre o nível tóxico e o nível mínimo de efeito, são necessárias várias dosagens. No entanto, com a utilização do DDS, é possível manter a concentração do fármaco dentro do nível terapêutico, conforme se pode observar nas curvas farmacocinéticas representadas na Figura 2-6, permitindo uma maior eficácia do tratamento (SILVA, 2006).

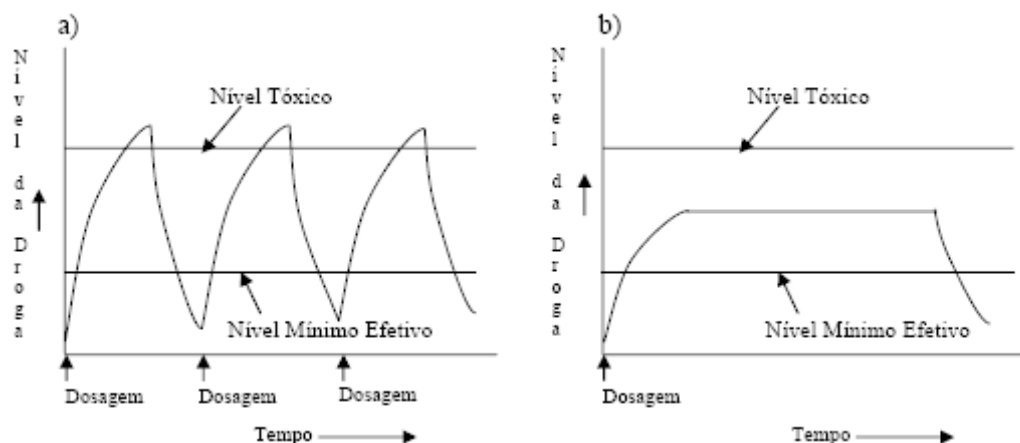


Figura 2-6 – Representação esquemática da curva farmacocinética: (a) método tradicional e (b) DDS (SILVA, 2006)

Um agente ativo pode ser liberado, utilizando-se géis poliméricos, a partir de diferentes mecanismos controladores da liberação (LANGER & PEPPAS, 2003). Os mecanismos controladores para os diferentes tipos de sistemas estão representados na Tabela 2-1.

Tabela 2-1 - Tipos de sistemas de liberação controlada de medicamento e seus mecanismos controladores da taxa de liberação – adaptada de SILVA (2006)

Tipo de Sistema	Mecanismo Controlador da Taxa de Liberação
Controlado pela Difusão	
Dispositivos por reservatórios (membranas)	Difusão através da membrana
Dispositivos monolíticos	Difusão através do seio (bulk) do polímero
Controlado pela Penetração de Água	
Sistema osmótico	Transporte osmótico da água através de uma membrana semipermeável
Sistema por expansão	Penetração de água em um polímero seco
Controlado Quimicamente	
Sistemas monolíticos	Por erosão ou pela combinação de erosão com difusão
Sistemas com grupos pendentes	Combinação entre a hidrólise do grupo pendente e a difusão através do polímero

2.5.2 PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS VIA GEL TERMOSENSÍVEL

As técnicas mais tradicionais na separação de proteínas de soluções biológicas são cromatografia, precipitação, ultrafiltração, cristalização e evaporação a vácuo. No entanto, essas técnicas apresentam um elevado custo envolvido, demandam muito tempo e normalmente são utilizadas em pequena escala. Dessa forma, buscando aprimorar o processo de separação, novas alternativas vêm sendo desenvolvidas, entre elas o uso de géis poliméricos.

O processo de separação utilizando géis poliméricos, também chamado de processo gel, proposto por Freitas e Cussler (FREITAS, 1986; FREITAS E CUSSLER, 1987a; FREITAS E CUSSLER, 1987b) se baseia na elevada capacidade de absorção de água dos géis, no seu comportamento termodinâmico e na sua seletividade. Hidrogéis termossensíveis são capazes de absorver várias vezes seu peso em água, absorvendo solvente e excluindo solutos de alta massa molecular, como as proteínas. Além disso, os géis termossensíveis apresentam estrutura estável e comportamento termodinâmico caracterizado por uma transição de fases, que permitem a reutilização em vários ciclos de separação (FREITAS, 1986).

Na Figura 2-7 tem-se um esquema simplificado do processo gel. Inicialmente, pequenos grânulos do gel seco são adicionados à solução que se deseja concentrar. A concentração inicial de macromoléculas na solução é C_i , estando a solução sujeita a uma temperatura inicial T_i . Ao entrar em contato com a solução, o gel polimérico se expande, absorvendo preferencialmente o solvente em detrimento ao soluto. A

solução resultante, agora com uma concentração C_f , maior que C_i , é separada do gel expandido por filtração. O gel expandido é submetido a um pequeno aumento de temperatura, até atingir uma temperatura final T_f , o que causa sua contração e a conseqüente liberação do solvente absorvido. Novamente é realizada uma filtração, que separa o gel do solvente retirado. Feito isso, o gel pode ser novamente utilizado no processo, por um grande número de vezes.

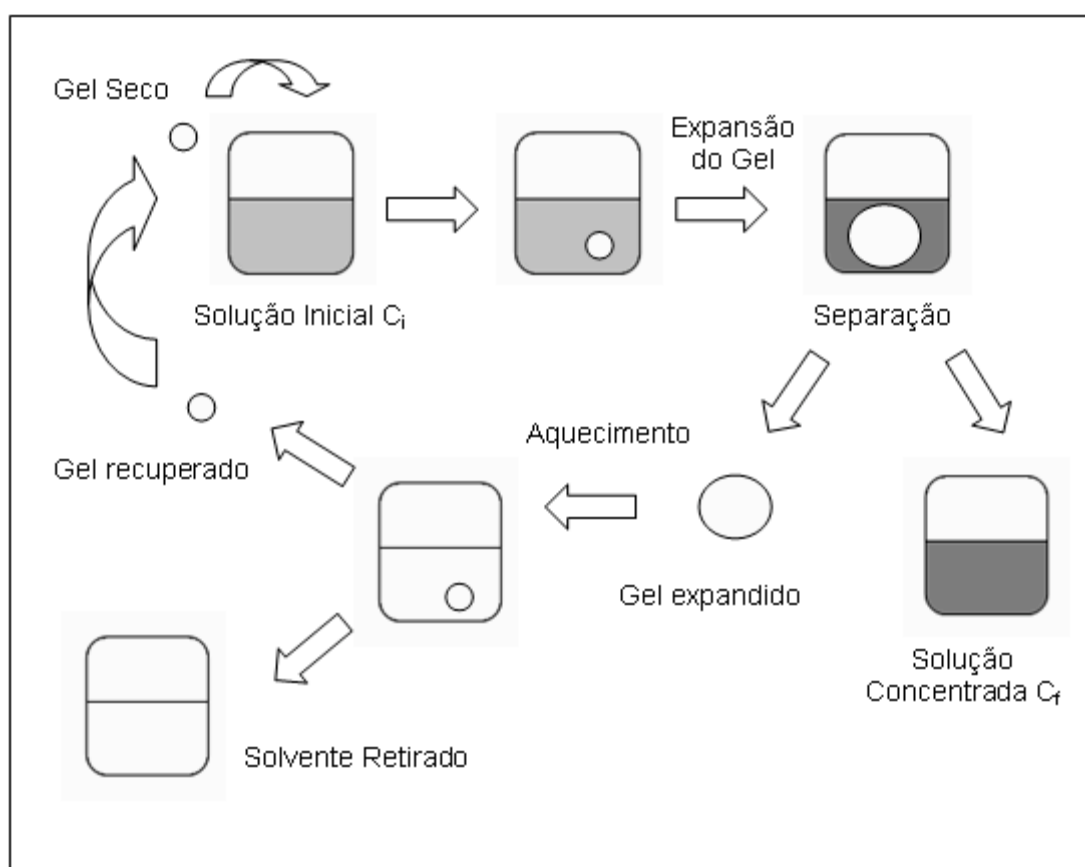


Figura 2-7 – Diagrama do processo de separação via géis termossensíveis (FREITAS, 1986; MIRANDA, 1990; CORREA, 2009)

O processo gel combina o comportamento de fases do gel, responsável pela variação abrupta do volume com a temperatura, com a seletividade necessária para impedir a entrada de moléculas do soluto em sua estrutura de rede tridimensional. A seletividade do gel pode ser melhorada a partir da síntese de um gel com uma

estrutura microreticular, que apresenta poros menores e uma maior quantidade de ligações cruzadas. Além disso, a seletividade também é função da interação polímero-solvente, de modo que o gel seja capaz de separar substâncias de tamanhos similares, mas com diferentes afinidades com o polímero.

A eficiência (η), do processo de separação pode ser obtida pela razão entre a diferença de concentração observada e a diferença máxima de concentração $\Delta C_{\text{máx}}$. A diferença de concentração observada (ΔC) é dada pela diferença entre a concentração final (C_f) e a concentração inicial (C_i), enquanto a diferença máxima de concentração ($\Delta C_{\text{máx}}$) é obtida considerando que todo soluto presente na solução inicial fique na solução concentrada, ou seja, a expansão do gel ocorre somente pela absorção do solvente, conforme se pode observar na equação 2.5 (FREITAS, 1986).

$$\eta = \frac{\Delta C}{\Delta C_{\text{máx}}} \times 100 = \frac{(C_f/C_i) - 1}{(V_{i \text{ SOL}}/V_{f \text{ SOL}}) - 1} \times 100$$

(equação 2.5)

Sendo V_{isol} o volume da solução antes da introdução do gel e V_{fsol} o volume da solução depois da introdução do gel.

Entre as vantagens do processo gel, pode-se citar a possibilidade de ser utilizado em larga escala, além de não requerer equipamentos complexos e caros. Adicionalmente, trata-se de um método de separação rápido, capaz de manter as propriedades físico-químicas e biológicas do soluto, que permite a recuperação do gel ao final do processo de separação (FREITAS, 1986; FREITAS & CUSSLER, 1987a).

Como exemplo de aplicação, géis poliméricos termossensíveis já foram empregados para a concentração de urina, visando à obtenção de calicreína humana em grande escala. A eficiência de separação foi bastante alta, quando comparada aos outros métodos comumente utilizados, não havendo alteração na atividade específica da calicreína após o processo de separação (MIRANDA, 1990).

Outra aplicação atual do uso de géis poliméricos consistiu na remoção do azul de metileno de soluções aquosas. O azul de metileno trata-se de um efluente produzido por indústrias, como, por exemplo, a têxtil, e que, ao ser descartado em rios e lagos, modifica o ecossistema. Utilizou-se o gel poli(N-isopropilacrilamida)/Humato de sódio (SH) e a capacidade máxima de absorção encontrada foi de 10,8 mg de azul de metileno por grama de gel (YI *et al.*, 2008).

2.6 GEL POLI(N-ISOPROPILACRILAMIDA)

Os géis termossensíveis mais estudados atualmente são os derivados da acrilamida (FREITAS, 1986), que apresentam a estrutura representada na Figura 2-8.

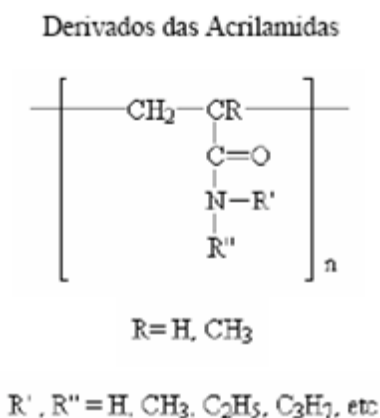


Figura 2-8 – Fórmula estrutural dos derivados da acrilamida – adaptado de SILVA (2006)

As poli(acrilamidas) são polímeros amorfos, solúveis em solventes polares, como, por exemplo, a água. Entre os polímeros derivados da acrilamida, a poli(N-isopropilacrilamida) – PNIPAAm trata-se de um dos mais estudados (OOYA *et al.*, 2005). O PNIPAAm pode ser obtido pela substituição de um dos hidrogênios da acrilamida por um grupo isopropil (C_3H_7).

O gel PNIPAAm foi sintetizado pela primeira vez por Freitas (FREITAS, 1986), apresentando estrutura de acordo com a Figura 2-9. Consiste em um hidrogel termossensível, com temperatura crítica inferior de aproximadamente 33°C. Assim, para temperaturas menores que a temperatura crítica, o gel se encontra no estado expandido, quando em contato com a água. Com o aumento da temperatura para acima da LCST, o gel sofre uma contração súbita, liberando o solvente que estava contido em sua estrutura tridimensional.

Poli(N-isopropilacrilamida)

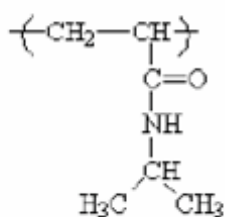


Figura 2-9 – Fórmula estrutural da poli(N- isopropilacrilamida) – adaptado de SILVA (2006)

A poli(N-isopropilacrilamida) pode ser sintetizada a partir de reações de copolimerização em solução, por crescimento em cadeia, via mecanismo de radicais livres. Os monômeros utilizados na reação de polimerização são N-isopropilacrilamida, (NIPAAm) e o agente reticulante, sendo o N,N'-Metilenobisacrilamida (MBAAm) um dos mais utilizados, representados na Figura

2-10. Os iniciadores empregados são o persulfato de amônio (AP) e metabissulfito de sódio (SM) (SILVA FILHO, 2005).

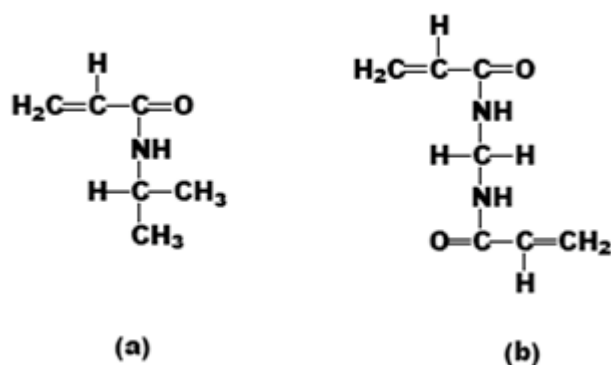


Figura 2-10 – Fórmulas estruturais: (a) Monômero vinílico N-isopropilacrilamida (NIPAAm) e (b) Monômero divinílico (agente reticulante) N, N'- metilenobisacrilamida (MBAAm) (SILVA FILHO, 2005)

A transição do gel entre os estados expandido e contraído é proveniente do balanceamento entre os grupos hidrofóbicos e hidrofílicos existentes na estrutura do gel (DIEZ-PEÑA *et al.*, 2002).

À temperatura ambiente, o PNIPAAm é capaz de absorver cerca de 30 vezes seu peso em água. No entanto, parâmetros de síntese, tais como o aumento na concentração total de monômeros e de agente reticulante, gera géis mais rígidos, que apresentam um grau de expansão menor.

2.7 CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS VIA ANÁLISE TÉRMICA

A análise térmica representa um conjunto de técnicas que possibilitam a medida de uma propriedade física de uma substância ou de seus produtos de reação em função da temperatura (SOUSA, 1997).

Os métodos térmicos são amplamente utilizados na caracterização de materiais e no controle de qualidade, uma vez que possibilitam a verificação de importantes propriedades do material analisado (SKOOG *et al.*, 2001).

A Tabela 2-2 mostra as diferentes técnicas de análise térmica utilizadas para se estudar diferentes propriedades físicas.

Tabela 2-2 – Propriedades analisadas em diferentes técnicas de Análise Térmica (SKOOG *et al.*, 2001)

Propriedade Física	Técnica
Massa	Termogravimetria (TG)
Temperatura	Análise Térmica Diferencial (DTA)
Entalpia	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)
Características Mecânicas	Análise Termomecânicas (TMA)
	Análise Termomecânica Dinâmica (DMA)
Características Elétricas	Medidas Termoelétricas
Características Magnéticas	Medidas Termomagnéticas

Neste trabalho, as duas propriedades que serão analisadas são a massa e a entalpia. Assim, considerações a respeito das técnicas de Termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) serão feitas a seguir.

2.7.1 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma técnica térmica na qual as diferenças no fluxo de calor na substância e na referência são medidas como uma função da temperatura da amostra, enquanto as duas são submetidas a um programa de temperatura controlada (SKOOG, 2001).

Nesta técnica registra-se a entalpia da amostra em função da temperatura. Durante o aquecimento, amostra e referência são mantidas à mesma temperatura e a entalpia é obtida pela diferença entre a quantidade de energia fornecida a cada uma delas. Assim, quando ocorre uma transição térmica na amostra, ou seja, uma mudança química ou física que resulte na emissão ou absorção de calor, energia térmica é acrescentada à amostra ou à substância de referência com o intuito de mantê-las a uma mesma temperatura. Desse modo, já que a energia adicionada corresponde à energia referente à transição térmica, obtêm-se os valores de variação de entalpia da amostra naquela determinada transição (GRULKE, 1994).

A DSC é capaz de registrar todos os eventos térmicos, incluindo as reações químicas, transições físicas, liberação de deformações, perdas por volatilidade e decomposição. Pode ser utilizada para medir a temperatura de transição vítrea (T_g) de uma substância. Na curva térmica da transição, a T_g corresponde à temperatura do ponto de inflexão (GRULKE, 1994).

2.7.2 TERMOGRAVIMETRIA (TG)

Em uma análise termogravimétrica, a massa de uma amostra em uma atmosfera controlada é registrada continuamente como uma função da temperatura ou do tempo à medida que a temperatura da amostra aumenta (SKOOG, 2001).

A termogravimetria deve ser empregada em processos que envolvam uma mudança na massa da amostra. Essas mudanças podem ocorrer pela perda de um componente volátil ou então pela degradação do material. Assim, a técnica não nos

indica pontos de mudança de estado físico, uma vez que nessas transições não ocorrerá variação de massa (SKOOG, 2001).

A TG pode ser aplicada para determinação de pureza, teores de umidade, voláteis e resíduos, composição de blendas e copolímeros, estudo da decomposição térmica de substâncias ou materiais, eficiência de retardantes de chama e antioxidantes, estudos cinéticos e curvas de adsorção e de absorção (SOUSA, 1997).

2.8 SORO DO LEITE

O leite, produto de secreção das glândulas mamárias, é um fluido viscoso, constituído por uma fase líquida e partículas em suspensão, formando uma emulsão líquida, estável em condições normais de temperatura ou de refrigeração, na qual a fase contínua é formada por água e substâncias hidrossolúveis. Já a fase interna, também denominada descontínua, é constituída por micelas de caseína e glóbulos de gordura. Possui elevado valor nutritivo, sendo uma das principais fontes de proteínas na alimentação de animais jovens e de humanos de todas as idades (SGARBIERI, 2005).

Do ponto de vista comercial e industrial, o leite bovino é o que apresenta uma maior importância, sendo composto por 87,3% de água e 12,7% de sólidos totais. Entre os 12,7% de sólidos totais, tem-se 3,3 a 3,5% de proteínas totais, 3,5 a 3,8% de gordura, 4,9% de lactose, 0,7% de minerais, além de vitaminas (SGARBIERI, 2005).

O Brasil é o sexto maior produtor mundial de leite bovino, apresentando um aumento anual da produção de aproximadamente 4%. De modo geral, 35% da produção de

leite são destinados à fabricação de queijos, principalmente mussarela, prato e minas frescal (BEHMER, 1986 *apud* SERPA *et al.*, 2009).

A produção anual de queijo é de 488 mil toneladas, segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ). Em média, dez litros de leite produzem cerca de um quilograma de queijo e nove litros de soro (BALDASSO, 2008). Este subproduto é um líquido quase opaco de cor branca a amarelada, sabor e odor lácteos característicos. Pode também ser chamado de soro de queijo ou lacto-soro, sendo resultado da precipitação de gorduras e caseínas do leite, durante a fabricação de queijos ou fabricação industrial da caseína (SERPA *et al.*, 2009).

A composição do leite, a concentração e a massa molecular dos componentes, bem como a distribuição desses componentes no soro e no coalho podem ser observados na Tabela 2-3.

Tabela 2-3 – Concentração e massa molecular dos componentes do leite, e distribuição média destes componentes no coalho e no soro – adaptado de MILLER *et al.* (2000); BRANS *et al.* (2004) *apud* BALDASSO (2008)

Componente	Leite (%) [*]	Massa Molecular (kDa)	Coalho (%) [*]	Soro (%) [*]
Água	87,1	< 0,1	6	94
Sólidos Totais	12,9	-	48	52
Caseínas	2,6	20 - 300	96	4
Proteínas do Soro	0,7	4 - 160	4	96
Gordura	4,0	100 - 15.000	94	6
Lactose	4,6	0,35	6	94
Minerais	0,7	< 1	62	38
Outros	0,32	-	-	-

* percentual mássico

O soro representa 85 a 90% do volume de leite e retém 55% de seus nutrientes. O queijo, por sua vez, retém proteínas caseínas e gorduras, que constituem a base do coalho (SERPA *et al.*, 2009). Além disso, na Tabela 2-3 observamos que, em média 96% das proteínas do soro e 94% da lactose presentes no leite permanecem no soro, enquanto apenas 4% da caseína presente no leite estão também no soro resultante do processo de coagulação enzimática do leite.

Por apresentar um alto valor nutricional, além do grande volume produzido, o soro é considerado um importante subproduto da indústria de laticínios. Entretanto, o descarte ilegal para rios ou esgotos públicos constitui grave problema ambiental, pois este descarte incorre em uma elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que pode variar entre 30.000 a 60.000mg.O₂/L de soro (BRANDÃO, 1994). Para efeitos de comparação, é importante ressaltar que essa carga poluente do soro é cerca de 100 vezes maior que a carga de um esgoto doméstico (PORTO *et al.*, 2005 *apud* BALDASSO, 2008).

Em processos de obtenção de queijo, cerca de 90% do volume de leite processado é considerado resíduo, sendo descartado sob a forma de soro lácteo. Esse baixo aproveitamento das indústrias alimentícias representa um significativo desperdício, não só nutricional como também financeiro. Dessa forma, grandes volumes de soro de leite são destinados à nutrição de suínos, ou então enviados para estações de tratamento de efluentes que, de modo geral, apresentam baixa eficiência e altos custos de operação (SERPA *et al.*, 2009).

Devido ao baixo nível de aproveitamento do soro de leite, torna-se necessária a importação de soro em pó, uma vez que o Brasil não apresenta capacidade de produção para suprir a demanda interna. O soro em pó é constituído por proteínas, que apresentam alto valor comercial e nutricional, além de gorduras, usadas para enriquecimento de outros produtos ou para o aumento do rendimento do processo de produção de queijos (SERPA *et al.*, 2009). Além disso, apresenta também lactose e minerais, que podem ser tratados e utilizados para outros fins (CARDI, 2007).

Portanto, o elevado nível de desperdício e impacto ambiental, juntamente com o alto valor nutritivo do soro, tem estimulado pesquisas referentes a técnicas para aproveitamento e concentração do soro lácteo, como, por exemplo, a utilização deste subproduto do leite na produção de biogás e etanol, bem como na obtenção de proteínas concentradas. Entretanto, entre os principais desafios encontrados pelos pesquisadores, destacam-se o alto percentual de água existente, o que inviabiliza a separação via desidratação, e a necessidade de se manter as propriedades físico-químicas e biológicas do produto após o processo de separação (SERPA *et al.*, 2009).

2.9 PRODUÇÃO DO SORO

Como o soro lácteo é obtido a partir do leite, pode-se dizer que o processo de obtenção do soro se inicia juntamente com o processo de obtenção do leite e seus derivados. O processamento de leite é geralmente feito visando à produção de leite para consumo (pasteurizado ou leite UHT) ou à produção de derivados, como requeijão, queijos, iogurtes e doces. A Figura 2-11 apresenta um fluxograma do processamento do leite e derivados.

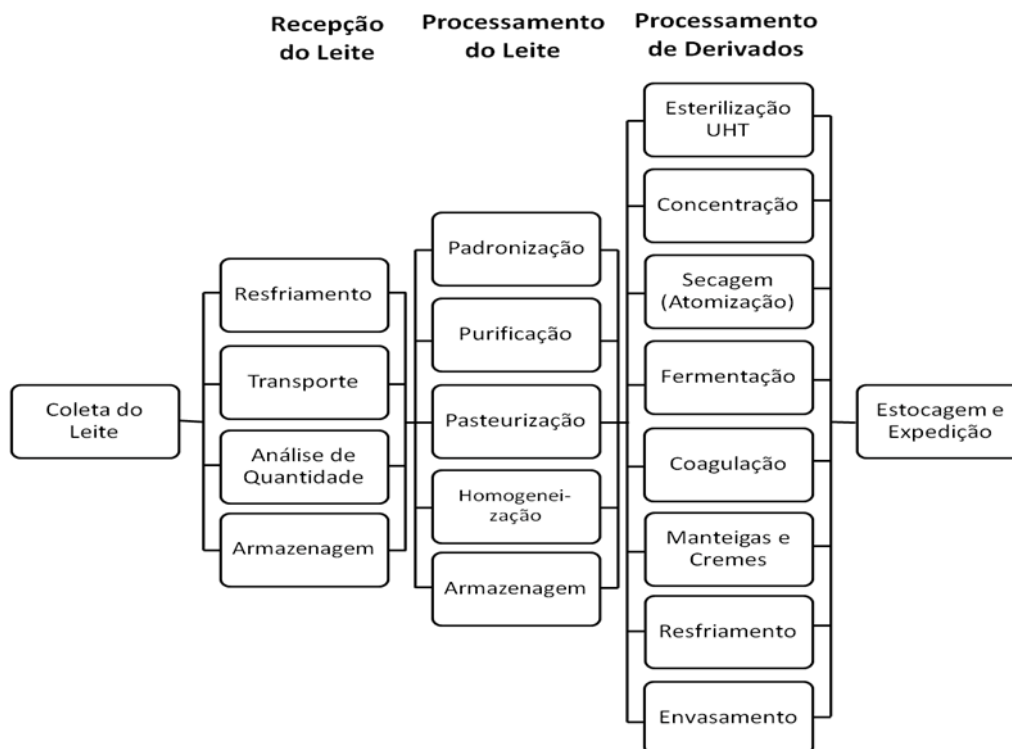


Figura 2-11 – Fluxograma das Etapas do Processamento em Usinas de Leite – adaptado de TECALIM (2009)

Dessa forma, a etapa inicial de toda usina de processamento consiste no recebimento do leite. Essa operação contempla, além do recebimento propriamente dito, a pesagem, filtragem e resfriamento do produto. Para facilitar o transporte das matérias-primas dentro da unidade de processamento, é comum o uso de esteiras transportadoras. Ao longo da esteira, existe um analisador, que tem a função de fazer uma análise inicial da qualidade do produto recebido. Essa inspeção contempla provas sensoriais e análises como acidez titulável, alizarol, gordura, temperatura e densidade, tendo como intuito avaliar as propriedades da matéria-prima de modo a garantir os padrões de qualidade do produto (TECALIM, 2009).

Logo após o resfriamento, geralmente para temperaturas entre 2 e 5°C, o leite é estocado em tanques isotérmicos, para ser pasteurizado e posteriormente encaminhado para as etapas subseqüentes do processamento. A pasteurização consiste no aquecimento do leite, para temperaturas entre 70 e 80°C, durante 15 a 20 segundos, seguido do resfriamento. O processo de pasteurização é capaz de eliminar grande parte dos patógenos e microorganismos presentes no leite cru (TECALIM, 2009).

A etapa de padronização, por sua vez, consiste na retirada parcial da gordura contida no leite, com o intuito de manter o produto final com uma proporção constante de gordura. O leite padronizado tipo C e UHT são padronizados para ter uma especificação de 3% de gordura. O creme retirado nessa etapa do processo, que utiliza geralmente desnatadeiras centrífugas, é utilizado na fabricação de derivados do leite (NEVES, 2001).

Após isso, o leite passa pela etapa de homogeneização, que consiste em guiar o fluido através de válvulas de alta pressão, com pequenos orifícios, de modo a reduzir o tamanho dos glóbulos graxos, presentes no leite, evitando a segregação da gordura. Desse modo, esse processo visa inibir a formação de nata no leite pasteurizado, contribuindo para manter o leite com uma aparência mais branca, além de melhorar o gosto e a digestão do produto formado. Finalmente, o leite é resfriado para temperaturas próximas de 5°C, sendo armazenado em tanques isotérmicos de estocagem, até prosseguir para o envasamento ou seguir para o processamento de derivados (NEVES, 2001).

A obtenção do soro do leite, em laboratórios ou indústrias, ocorre principalmente por três processos: coagulação enzimática (enzima quimosina/renina), resultando no coágulo de caseínas, matéria-prima para a produção de queijos, e no soro doce (Figura 2-12); precipitação ácida no ponto isoelétrico (pI), resultando na caseína isoelétrica, que pode transformada em caseinatos e no soro ácido (Figura 2-13); separação física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se um concentrado de micelas e proteínas do soro, na forma de concentrado ou isolado protéico (Figura 2-14) (ZINSLY *et al.*, 2001).

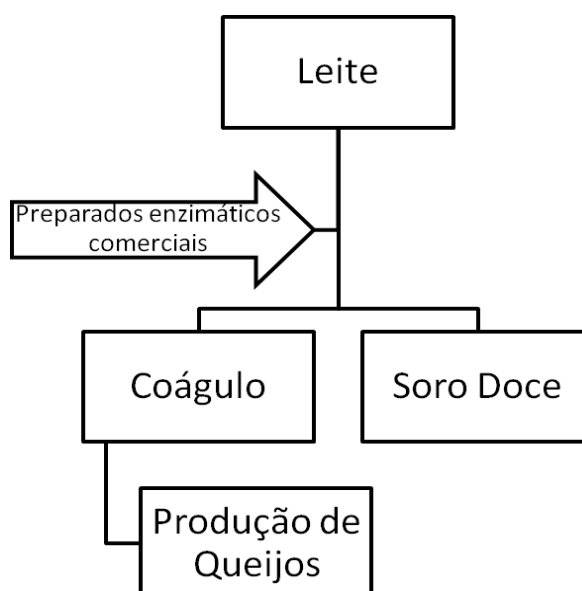


Figura 2-12 – Fluxograma simplificado do processo de coagulação enzimática – adaptado de SGARBIERI (2005)

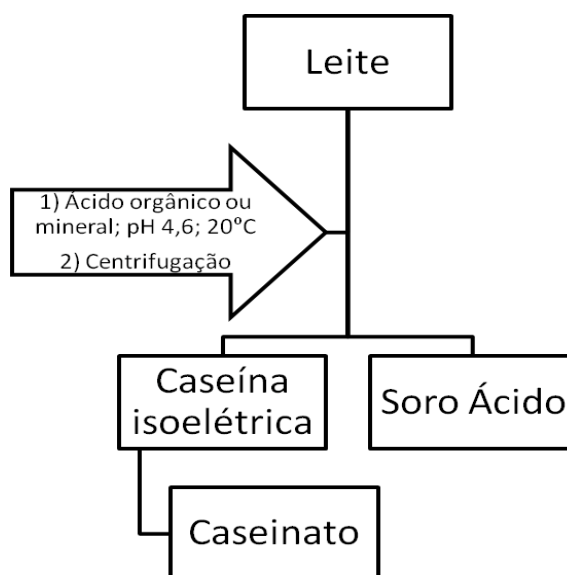


Figura 2-13 – Fluxograma simplificado do processo de Precipitação pela acidificação com ácido orgânico ou mineral – adaptado de SGARBIERI (2005)

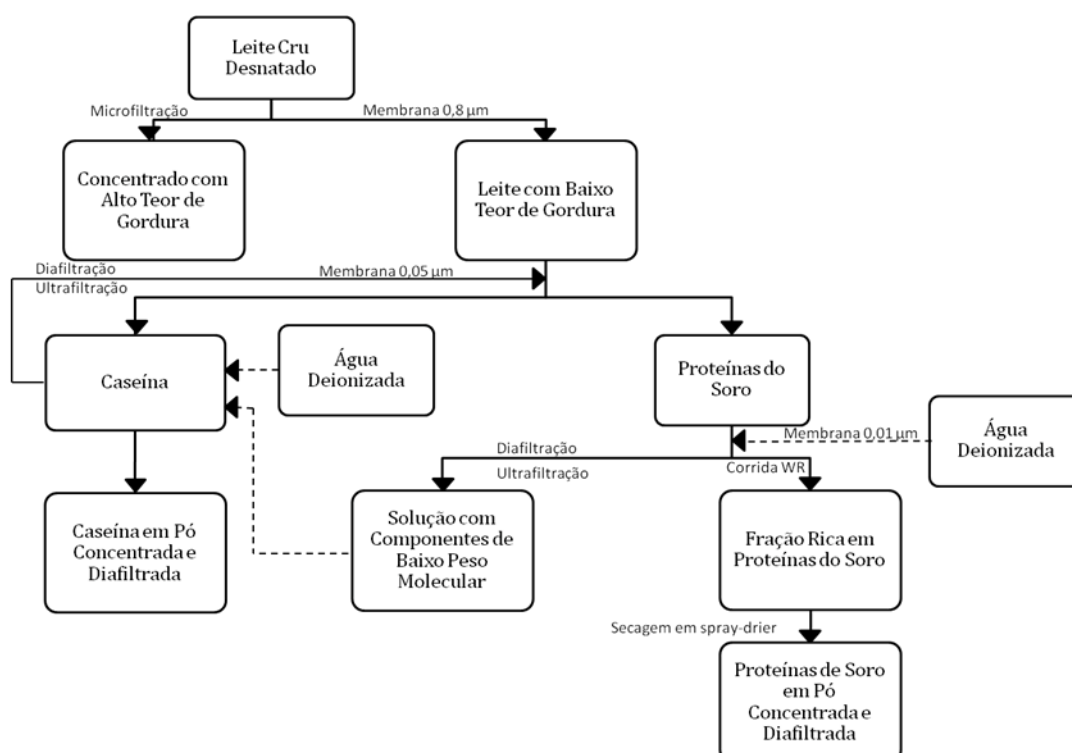


Figura 2-14 – Fluxograma simplificado do processo de separação por membranas – adaptado de BALDASSO (2008)

Neste trabalho, o soro utilizado para a realização dos experimentos, doado pela empresa Sooro, é proveniente do processo de fabricação do queijo; portanto, é dado enfoque ao processo de coagulação enzimática visando à obtenção de soro doce em pó.

O processo de fabricação de queijo consiste na transformação de componentes do leite em um produto de fácil conservação, menor volume e elevado valor nutritivo. Além dessas características, o produto formado apresenta aroma e sabor agradável. No entanto, o rendimento desse processo não atinge valores elevados. Destarte, a eficiência do processo costuma apresentar valores entre 8,5 e 20%, gerando, como um de seus subprodutos, o soro. O processo simplificado de produção de queijo, tipo mussarela, está representado na Figura 2-15.

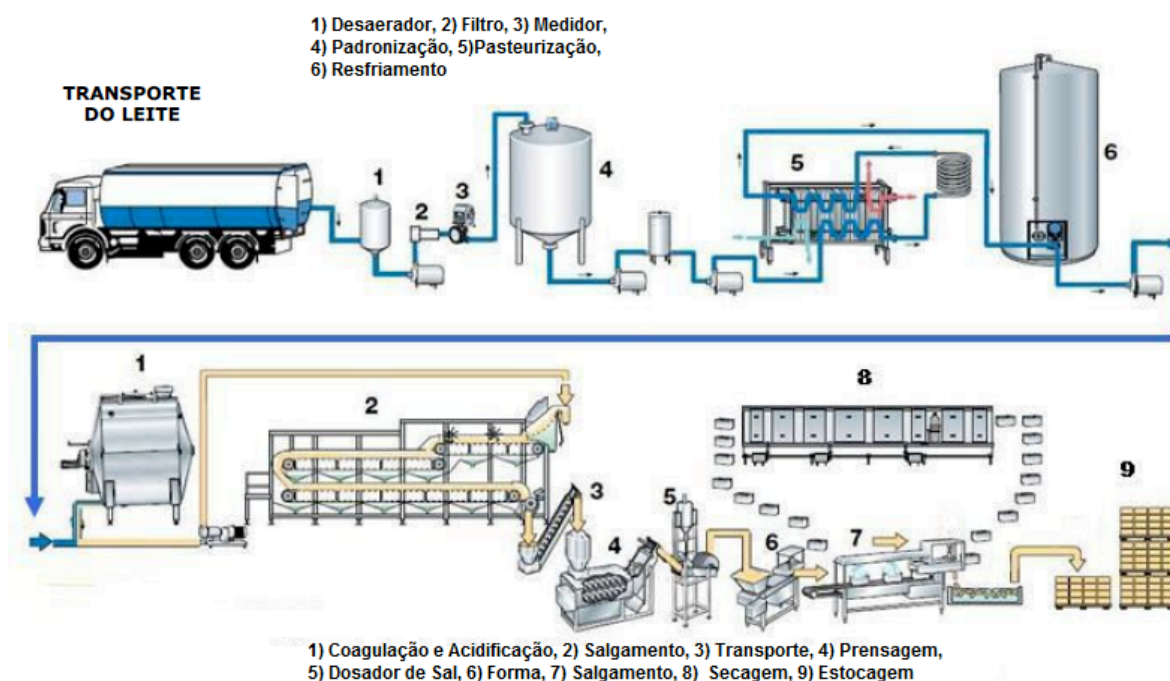


Figura 2-15 – Fluxograma simplificado da produção de queijo tipo Mussarela – adaptado de TECALIM (2009)

O leite comumente utilizado no processo de produção de mussarela apresenta um teor de gordura que varia entre 3,2 e 3,5%. Esse leite segue as mesmas etapas iniciais do processo de produção do leite integral, no entanto, após a pasteurização e padronização, é encaminhado para tanques de coagulação, nos quais sofre aquecimento para uma temperatura de cerca de 33°C e é adicionado coalho para o prosseguimento do processo (BOSCHI, 2006).

O tipo de cultura utilizada depende do tempo de maturação desejado. Para processos de fermentação lenta da massa, costuma-se utilizar culturas mesófilas, compostas por *Lactococcus lactis* e *Lactococcus cremoris*. Já no caso da fermentação rápida, utiliza-se culturas termófilas constituídas por *Lactococcus thermophilus* e *Lactococcus bulgaricus*. Em ambos os casos, o volume de culturas empregado é função do volume total de leite, podendo essa razão apresentar valores entre 0,5 e 2% (TECALIM, 2009).

Além das culturas, também se adiciona cloreto de cálcio com o intuito de repor o cálcio perdido durante o processo de pasteurização. A quantidade de cálcio utilizada também depende do volume total de leite, sendo adicionados 50 ml, de uma solução de 50% de concentração, para cada 100 litros de leite. O tempo de coagulação geralmente utilizado varia de 35 a 40 minutos, devendo a quantidade de coalho empregada satisfazer esse critério (SALINAS, 2002).

Assim, a massa deve ser cortada de forma a obter finos grãos, de volume aproximado 0,5 cm³, sendo agitada e aquecida até 40°C até que seja atingido o ponto de dessoragem, ou seja, a retirada do soro. A massa é então transferida para

tanques de pré-prensagem, nos quais o dessoramento é completado. O bloco sólido obtido é dividido em partes menores, que são mantidos no próprio tanque até que o grau de fermentação adequado seja atingido. Os blocos são mantidos na temperatura de 38°C por aquecimento indireto, com a finalidade de manter a acidez requerida para a filagem. O ponto de filagem é alcançado quando a massa, após a imersão em água quente em temperaturas próximas a 80°C, é capaz de formar fios elásticos sem arrebentar (SALINAS, 2002).

A etapa subsequente do processo consiste no corte e moldagem. A massa filada é moldada em formas, sendo submetida a salga em uma salmoura a 20% de sal, na proporção de três litros de salmoura para cada quilo de queijo. A temperatura mantida na salga costuma ser de 12°C e o tempo varia de acordo com o formato do queijo. Por fim, o queijo é embalado a vácuo e mantido em câmara fria até ser comercializado (SALINAS, 2002).

Portanto, no processo de produção de queijo, o soro pode se originar das etapas de corte, agitação, aquecimento, enformagem e prensagem. De acordo com o tipo de queijo produzido, o soro resultante pode ser dito ácido ou doce. O soro doce, que apresenta pH entre 6,3 e 6,6, é obtido pela coagulação enzimática do leite, a partir da adição da enzima quimosina/renina. Costuma, de modo geral, ser obtido como subproduto de processos de produção de queijos amadurecidos duros, semi-duros ou macios, como, por exemplo, provolone, mussarela e cheddar. Já o soro ácido, cujo pH varia entre 4,3 e 4,6, é oriundo da coagulação ácida do leite em processos de fabricação de caseína comercial e de queijos tipo cottage (BOSCHI, 2006). A

Tabela 2-4 indica a composição dos dois tipos de soro, em comparação com o leite bovino.

Tabela 2-4 – Composição do leite e dos soros doce e ácido – adaptado de ANTUNES (2003) *apud* BOSCHI (2006)

Componente	Leite (%)	Soro Doce (%)	Soro Ácido (%)
Sólidos Totais (ST)	13,0	6,4	6,2
Proteína	3,6	0,8	0,75
Gordura	3,9	0,5	0,04
Lactose	4,6	4,6	4,2
Cinza	0,8	0,5	0,8
Ácido Láctico	-	0,05	0,4

Para a alimentação humana, o soro do leite é utilizado principalmente sob a forma em pó, embora também esteja presente sob a forma líquida ou condensada. Como vantagens do soro em pó, pode-se citar a facilidade de armazenamento sem que haja perda das propriedades nutricionais, além de menores custos com transporte e estocagem (MILLER *et al.*, 2000; HUFFMAN, 1996).

Existem várias metodologias para a obtenção de soro em pó. O processamento do soro líquido para transformação em produto seco pode ser observado na Figura 2-16.

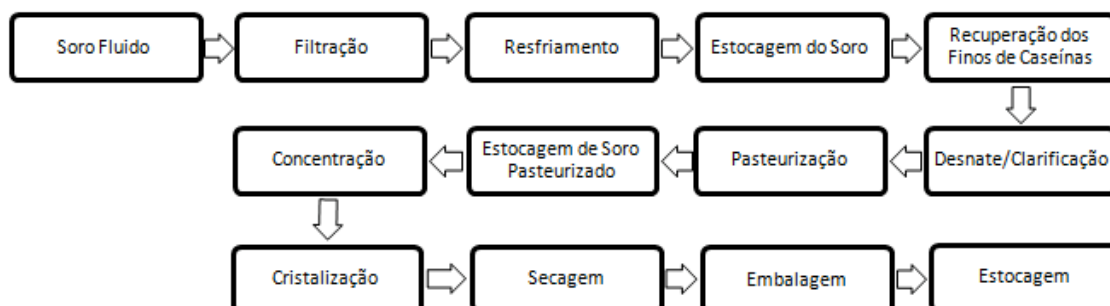


Figura 2-16 – Fluxograma da produção de soro de queijo em pó – adaptado de ELEGE (2005) *apud* BOSCHI (2006)

As operações unitárias existentes são bastante semelhantes às utilizadas no processamento do leite. A concentração é geralmente feita em evaporadores, à temperatura de 85°C. No entanto, também podem ser utilizadas plantas de osmose reversa para estágios de pré-concentração. Após a evaporação, o concentrado apresenta entre 45 e 65% de sólidos totais. Assim, o concentrado vai para um tanque sujeito a um lento resfriamento com o intuito de que os cristais originados na etapa de cristalização sejam finos (BYLUND, 1995 *apud* BALDASSO, 2008). Para casos em que o teor de lactose é baixo, a remoção desses cristais pode ser feita utilizando-se centrifugação. Já a secagem do soro costuma ocorrer em secadores do tipo tambor ou “spray drier” (BALDASSO, 2008).

2.10 PRINCIPAIS COMPONENTES DO SORO LÁCTEO

A composição do soro do leite varia em função da raça do rebanho, de razões sazonais, do tratamento ao qual o leite é submetido durante a produção do queijo e também do tratamento sobre o soro lácteo após a separação do coalho (ZADOW, 1992 *apud* BALDASSO, 2008). A composição média do soro doce é apresentada na Tabela 2-5.

Tabela 2-5 – Composição aproximada do soro doce – adaptado de MILLER *et al.* (2000); BYLUND (1995); YADA (2004) *apud* BALDASSO (2008)

Componente	Soro Doce (%)*
Água	93 - 95
Sólidos Totais (ST)	5,5 - 6,5
Proteína	0,7 - 1,2
Gordura	0,04 - 0,05
Lactose	3,8 - 5,0
Cinzas	0,5 - 0,8
NPN	0,15 - 0,18

* percentual mássico

O componente NPN se refere à classe de nitrogênio não protéico, que contempla compostos de baixa massa molecular, como uréia, amônia, ácido úrico, creatinina, aminoácidos e produtos da degradação enzimática das caseínas (PEREIRA, 2002 *apud* BALDASSO, 2008).

Nota-se que lactose, proteínas e minerais praticamente constituem todo o conjunto dos sólidos totais. Desse modo, esses constituintes serão detalhados nos subitens subseqüentes.

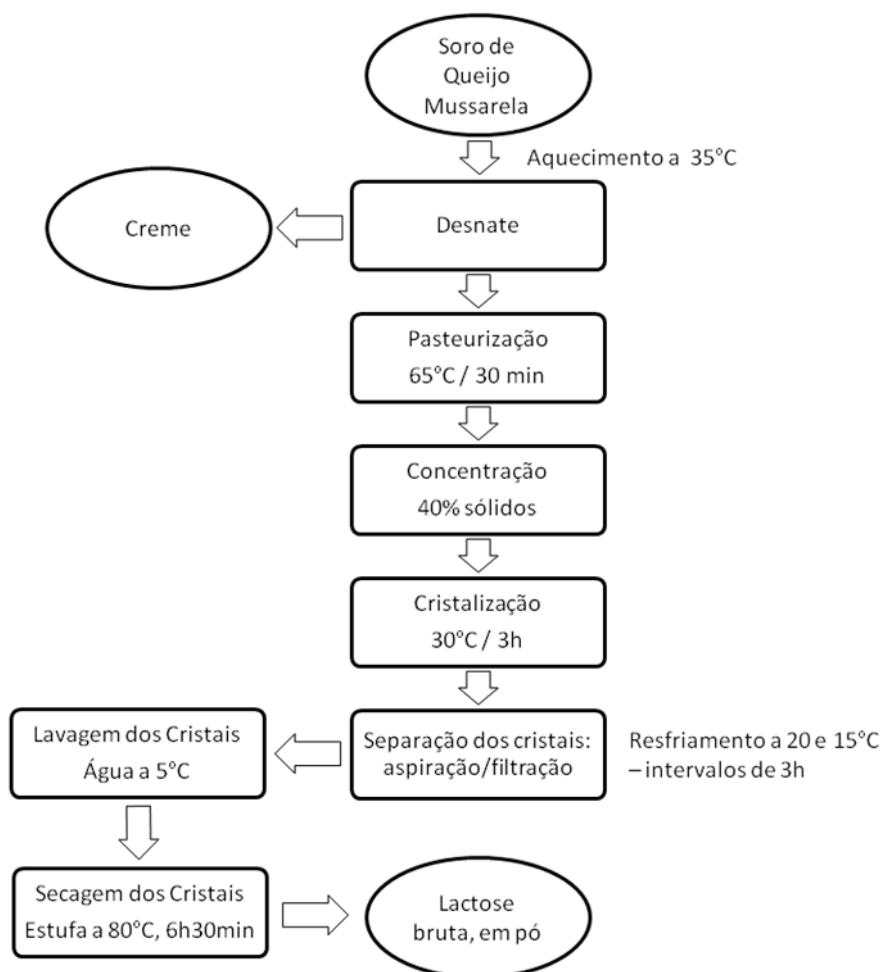
2.10.1 LACTOSE

A lactose, mais comumente conhecida como “açúcar do leite”, é o carboidrato característico do leite. Trata-se de um dissacarídeo redutor formado por galactose e glicose, sendo o componente presente em maior proporção na massa seca do leite. Seu conteúdo atinge, em média, 50 g por litro de leite (VESSEYRE, 1988).

A lactose é utilizada em larga escala em edulcorantes e produtos farmacêuticos, sendo também freqüentemente utilizada como meio fermentativo para a cultura de diversos microrganismos de interesse tecnológico (LUQUET, 1993).

Devido à elevada quantidade de lactose presente no soro, muitos estudos têm sido desenvolvidos visando à utilização desse carboidrato para obtenção de produtos com maior valor agregado, o que contribui para minimizar a carga poluidora do soro

(WASZCZYNSKYJ & MACIEL, 1998). A Figura 2-17 apresenta um fluxograma do processo para a obtenção da lactose a partir do soro de queijo mussarela.



**Figura 2-17 – Fluxograma de obtenção de lactose bruta em pó
(WASZCZYNSKYJ & MACIEL, 1998)**

2.10.2 SAIS MINERAIS E VITAMINAS

O soro contém a maioria das vitaminas hidrossolúveis do leite, como vitamina B12, B6, C e A. Além disso, também apresenta constituintes como ácido pantotênico, riboflavina e tiamina (MILLER *et al.*, 2000). As quantidades das vitaminas que compõem o soro estão apresentadas na Tabela 2-6.

Tabela 2-6 – Quantidades médias de vitaminas e minerais em 100 g de soro doce em pó – adaptado de MILLER *et al.* (2000) *apud* BALDASSO (2008)

Constituinte	Quantidade	Unidade
Vitaminas		
Vitamina A	44	IU
Vitamina C	1,5	mg
Vitamina E	0,03	mg
Tiamina (B1)	0,5	mg
Riboflavina (B2)	2,2	mg
Piridoxina (B6)	0,6	mg
Vitamina B12	2,4	mg
Ácido Pantotênico	5,6	mg
Niacina	1,3	mg
Minerais		
Cálcio	796	mg
Fósforo	931	mg
Sódio	1079	mg
Potássio	2080	mg
Magnésio	176	mg
Zinco	1,97	mg

Os principais sais encontrados no soro do leite são fosfatos, citratos, cloretos, sulfatos, carbonatos, bicarbonato de sódio, potássio, cálcio e magnésio. Em menores proporções, também estão presentes outros vinte elementos, entre eles o cobre, o ferro, o silício, o zinco e o iodo. Além de apresentarem importância na nutrição, esses sais são essenciais na preparação, processamento e armazenamento de produtos derivados do leite, uma vez que influenciam diretamente a conformação e estabilidade das proteínas (FOX & McSWEENEY, 1998; BYLUND, 1995 *apud* BALDASSO, 2008).

2.10.3 PROTEÍNAS

As proteínas podem ser definidas como macromoléculas constituídas por aminoácidos. Cada aminoácido possui um grupamento amina e um grupo carboxila, ligados ao mesmo carbono principal (SGARBIERI, 1996; ZINSLY *et al.*, 2001).

De acordo com as propriedades físico-químicas das proteínas do leite, essas se dividem em quatro grupos: caseínas, enzimas e fatores de crescimento, proteínas das membranas dos glóbulos de gordura e proteínas do soro (SGARBIERI, 1996; LOURENÇO, 2000). As principais frações consistem na caseína e nas proteínas do soro, que representam juntamente entre 3,3 e 3,5% da composição do leite (SGARBIERI, 1996 *apud* SERPA, 2005).

As caseínas e as proteínas do soro apresentam propriedades fisiológicas e biológicas distintas. As caseínas, quando em contato com o cálcio, formam partículas coloidais, denominadas micelas. Por sua vez, as proteínas do soro, “whey proteins”, proteínas solúveis ou não-caseínas, são de natureza globular, sendo mais solúveis em água do que as caseínas (SGARBIERI, 1996).

É importante ressaltar que, diferentemente das proteínas caseínas, as proteínas do soro são insensíveis à coagulação ácida, assim como à ação da quimosina/renina. Assim, durante o processo de formação do coalho, as proteínas do soro, assim como a lactose, permanecem em solução, enquanto a caseína se coagula juntamente com a gordura (SGARBIERI, 1996).

O soro do leite apresenta, em sua composição, entre 0,7 e 1,2% proteínas, que corresponde a cerca de 20% do total de proteínas encontradas no leite. Os 80% restantes correspondem às caseínas (SILVA & VAN DENDER, 2005).

A parte protéica do soro apresenta β -lactoglobulina (β -Lg), α -lactoalbumina (α -La), Albumina do soro bovino (BSA), Imunoglobulinas (Ig), Lactoferrina, Lactoperoxidase, Glicomacropéptídeos e Proteose-peptonas como principais proteínas globulares (MILLER *et al.*, 2000; ZYDNEY, 1998).

A Tabela 2-7 apresenta propriedades das proteínas do soro, tais como a massa molecular, o ponto isoelétrico e as concentrações médias no soro.

Tabela 2-7 – Propriedades e concentração das proteínas do soro – adaptado de MILLER *et al.* (2000); ZYDNEY (1998) *apud* BALDASSO (2008)

Proteína	Massa Molecular (kDa)	Ponto Isoelétrico	Concentração (g/L)
β -Lg	18,3	5,2	2,0 - 4,0
α -La	14,1	4,2 - 4,8	0,6 - 1,7
BSA	69,0	4,7 - 4,9	0,1 - 0,4
Ig	15,0 - 160,0	5,5 - 8,3	0,6 - 1,0
Proteose-Peptonas	4,1 - 80,0	3,3 - 3,7	1,4
Lactoferrina	78,0	9	0,1
Lactoperoxidase	89,0	9,5	0,02
Glicomacropéptídio	7,0	-	0,02

A Figura 2-18 representa as concentrações médias das proteínas de soro obtidas a partir de 10 litros de leite. Observa-se que a proteína mais abundante no soro é a β -Lg, seguida pela α -La.

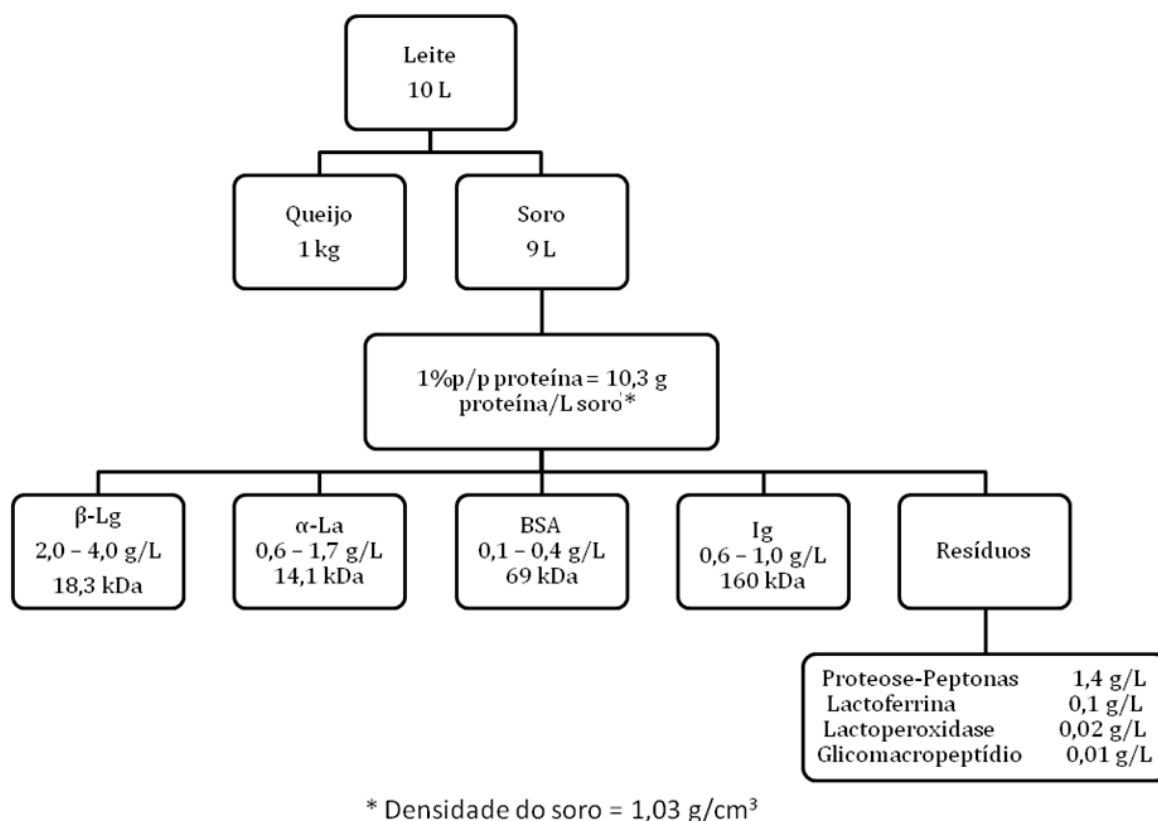


Figura 2-18 – Concentrações médias das proteínas de soro obtidas a partir do leite

2.10.3.1 β-LACTOGLOBULINA (β-LG)

A β-lactoglobulina, mais comumente chamada de β-LG, trata-se de uma proteína globular que apresenta duas variantes genéticas (A e B). A variante A apresenta massa molecular de 18,362 kDa, enquanto a variante B possui massa molecular de 18,276 kDa, contendo 162 resíduos de aminoácidos (SGARBIERI, 2005). O pI da β-LG ocorre em um pH de 5,2, sendo que a variante B apresenta um valor ligeiramente superior que a variante A (PANICK *et al.*, 1999).

Em relação ao arranjo espacial, a molécula da β-LG é constituída por nove segmentos em folhas antiparalelas, que formam uma estrutura de cálice, que permite

a ligação com pequenas moléculas hidrofóbicas em seu interior. Essa estrutura é característica da família de proteínas lipocalinas, o que faz com que sejam utilizadas em funções de transporte (BROWNLOW *et al.*, 1997; LANGE *et al.*, 1998 *apud* SGARBIERI, 2005).

Além da função de transporte, a estrutura em cálice, típica das lipocalinas, proporciona à β -LG várias propriedades funcionais úteis em aplicações de indústrias alimentícias, tais como capacidade de emulsificação, formação de espuma, geleificação e ligação de aroma e sabor (MORR & FOEGEDING, 1990 *apud* SGARBIERI, 2005). Adicionalmente, a estrutura em cálice garante a estabilidade da β -LG em uma ampla faixa de pH. No entanto, de acordo com o pH do meio, ela pode apresentar diferentes estados de associação (TAULIER & CHALIKIAN, 2001).

Dependendo do pH do meio, a β -LG pode apresentar cinco estágios de transição para uma faixa de pH entre 1 e 13 (TAULIER & CHALIKIAN, 2001). Para um pH entre 1 e 2, a β -LG passa por mudanças em sua estrutura secundária, mantendo sua estrutura primária. Com o aumento do pH, para a faixa entre 2,5 e 4,0, ocorre a dissociação do dímero, formando o monômero. No intervalo seguinte de pH, que apresenta valores entre 4,5 e 6,0, a estrutura terciária é mantida, sendo as alterações ocorridas na estrutura quaternária. Já a transição de Tanford, para pH entre 6,5 e 8,5, consiste em alterações localizadas nas estruturas secundária e terciária, sem que haja uma mudança na conformação global da proteína. A última transição, por sua vez, ocorre entre valores de pH de 9,0 e 12,5, se caracterizando pela desnaturação alcalina, consistindo na quebra das estruturas diméricas originais e na conseqüente formação de monômeros. Essa desnaturação induzida por base

alcalina apresenta caráter irreversível (TAULIER & CHALIKIAN, 2001; SGARBIERI, 2005).

Por se tratar de uma proteína termossensível, a variação da temperatura pode ocasionar alterações nas propriedades da β -LG, como, por exemplo, perda da solubilidade e alterações de conformação, podendo causar exposição de diferentes regiões da molécula, o que acarreta em alterações nas interações da proteína com outros componentes (IAMETTI *et al.*, 1996 *apud* SGARBIERI, 2005).

Assim como modificações irreversíveis são possíveis com alterações no pH, isso também ocorre para variações na temperatura. Para temperaturas entre 65 e 70°C, a β -LG está sujeita a modificações irreversíveis, enquanto para temperaturas na faixa de 50°C ocorrem alterações reversíveis apenas. Com o intuito de avaliar apenas a influência da temperatura, o pH deve ser mantido como neutro. Desse modo, o aquecimento provoca a quebra da proteína dimerizada original em monômeros. Assim, a proteína passa de uma conformação globular compacta para um estado de maior flexibilidade, com maior volume em sua estrutura terciária, devido a uma maior exposição dos grupos hidrofóbicos presentes. Posteriormente, as moléculas se associam através de pontes dissulfeto e interações hidrofóbicas nas em folhas β (PALAZOLO *et al.*, 2000; PHOTCHANACHAI & KITABATAKE, 2001; SGARBIERI, 2005).

De maneira análoga ao que acontece com variações de temperatura e pH, a β -LG também apresenta variações estruturais ocasionadas por variação na pressão (YANG *et al.*, 2001). De modo geral, o processo de monomerização se inicia entre

pressões de 100 e 150 MPa. Entre 150 e 250 Mpa, inicia-se uma alteração na estrutura secundária da proteína, gerando um estado de grande flexibilidade, no qual a renaturação ainda é possível. No entanto, para pressões da ordem de 330 MPa, as estruturas β são destruídas. Para pressões entre 600 e 900 MPa, ocorre a formação de agregados que são estabilizados por interações de natureza hidrofóbica, além de ligações de intercâmbio, entre átomos de enxofre (SGARBIERI, 2005).

Mesmo com o grande conhecimento sobre estruturas e conformações da β -LG, sua função biológica ainda não está completamente elucidada. Estudos de fluorescência já mostraram que a β -LG forma complexos solúveis em água com retinol, através de ligações hidrofóbicas (JANG & SWAISGOOD, 1990 *apud* SGARBIERI, 2005).

Além disso, a β -LG apresenta efeito protetor, inibindo a destruição térmica do ácido ascórbico em solução aquosa (DAI-DONG *et al.*, 1990 *apud* SGARBIERI, 2005). Outra aplicação biológica da β -LG refere-se à influência de seus derivados no nível de colesterol sérico. Estudos com a célula-Caco-2 mostraram que os peptídios foram capazes de induzir a supressão da absorção do colesterol. O peptídeo (Ile Ile Ala Glu Lys) apresentou, em ratos, maior atividade que o β -sitosterol (NAGOKA *et al.*, 2001 *apud* SGARBIERI, 2005).

2.10.3.2 α -LACTALBUMINA (α -LA)

A proteína α -lactalbumina, mais comumente chamada de α -LA, apresenta duas variantes genéticas (A e B), no entanto apenas a variante B tem sido encontrada em

leite das raças bovinas ocidentais. Essa variante possui massa molecular de 14,176 kDa, contendo 123 resíduos de aminoácidos e apresentando quatro pontes dissulfeto (SGARBIERI, 2005).

A proteína α -LA apresenta forte tendência em formar associações para valores de pH inferiores ao pl. O pH natural do leite é 6,6. Para valores maiores ou iguais a esse pH, a α -LA apresenta-se como monômero (SGARBIERI, 2005).

A seqüência de aminoácidos da α -LA apresenta bastante semelhança com a da lisozima, presente na clara de ovo, apresentando uma homologia de seqüência de 32% (VANAMAN *et al.*, 1970; BROWNE *et al.*, 1969 *apud* SGARBIERI, 2005).

Além disso, a α -LA possui uma alta afinidade com cátions, como Ca^{+2} e outros íons metálicos, tais como Zn^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} , Cu^{+2} e Al^{+3} . A ligação com o cálcio auxilia na estabilização da proteína, inibindo a desnaturação térmica. A desnaturação reversível da α -LA, em solução, ocorre em temperaturas próximas a 64°C (STUART *et al.*, 1986 *apud* SGARBIERI, 2005).

De maneira similar à maioria dos componentes do leite, a α -LA é sintetizada nas glândulas mamárias. Em termos biológicos, essa proteína é capaz de modificar a especificidade da enzima D-glicose 4- β -galactosil transferase, responsável pela síntese da lactose nas glândulas mamárias (SGARBIERI, 2005). A presença da α -LA acelera transferência da galactose para glicose, tornando-a o substrato preferencial da enzima galactosil-transferase. Já na ausência de α -LA, a transferência de

galactose ocorre da UDP-galactose para a N-acetilglicosaminil-glicoproteína, mesmo que haja glicose no meio (EBNER & MCKENZIE, 1972 *abud* SGARBIERI, 2005).

2.10.3.3 LACTOFERRINA

Outra proteína constituinte do leite é a lactoferrina, que consiste em uma glicoproteína, de massa molecular 86,1 kDa. Essa proteína se liga na proporção de 1:2 com ferro, gerando uma solução com coloração salmão-avermelhada. Trata-se de uma proteína básica, com pI para pH igual a 8, que apresenta forte tendência em formar produtos de interação. Dessa forma, apresenta comportamento eletroforético heterogêneo tanto em géis alcalinos quanto ácidos. Quando ligado com o ferro, a lactoferrina apresenta resistência ao calor e à ação química e enzimática (SGARBIERI, 2005).

Além disso, a lactoferrina forma compostos oriundos de quelação com o Fe^{+3} , exercendo atividade bacteriostática contra organismos dependentes do ferro, presentes no leite. Do ponto de vista intestinal, a lactoferrina atua como agente imunoestimulante, agindo como fator de crescimento e maturação dos enterócitos (MCINTOSH *et al.*, 1998 *apud* SGARBIERI, 2005).

2.10.3.4 IMUNOGLOBULINAS

As imunoglobulinas constituem uma família de proteínas de elevada massa molecular com propriedades físicas, químicas e imunológicas bastante heterogêneas. As imunoglobulinas constituem o soro sanguíneo e outros fluidos corporais, como, por exemplo, o colostro, no qual estão presentes em elevada

concentração, sendo responsáveis pela transmissão de imunidade passiva aos recém-nascidos (SGARBIERI, 2005).

As imunoglobulinas podem estar sob a forma de monômeros ou polímeros formados por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias curtas e duas cadeias longas, ligadas por pontos dissulfeto. Já foram identificadas no soro e no leite bovino as classe de imunoglobulinas IgG (G1 e G2), IgA e IgM (BUNNER, 1977 *apud* SGARBIERI, 2005).

As imunoglobulinas do tipo Ig apresentam entre 2 e 4% de carboidratos, tendo uma massa molecular de 160 kDa e existindo, de modo geral, como monômeros. A IgG1 trata-se da imunoglobulina presente em maior concentração no leite. O colostro apresenta em sua composição tanto IgG1 quanto IgG2, com altíssima concentração de IgG1, chegando à metade das proteínas totais existentes no soro (SGARBIERI, 2005).

Já a IgA trata-se de uma macroglobulina presente em baixas concentrações no leite, estando presente sob a forma de pentâmeros, com massa molecular de cerca de 900 kDa e contendo 12% de carboidrato (SGARBIERI, 2005).

A IgM, por sua vez, está presente sob a forma de um dímero, com massa molecular de 400 kDa, possuindo cerca de 8% de carboidratos. Essa imunoglobulina possui propriedades antigênicas diferentes dos outros tipos de imunoglobulinas. A imunoglobulina existente no leite se difere da presente no soro sanguíneo devido à

ligação a uma glicoproteína, conhecida como Fator Secretor Livre (FSL) (SGARBIERI, 2005).

2.10.3.5 Albumina do Soro Bovino (BSA)

A BSA corresponde a cerca de 10% das proteínas do soro do leite. É um peptídeo de alto peso molecular (66kD), rico em cistina (aproximadamente 6%), e relevante precursor da síntese de glutatona. Possui afinidade por ácidos graxos livres e outros lipídeos, favorecendo seu transporte na corrente sangüínea (HARAGUCHI, 2005).

2.11 PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS DO SORO E APLICAÇÕES

Aminoácidos são ditos essenciais quando o organismo humano não é capaz de sintetizá-los. Oito dos vinte tipos de aminoácidos existentes são considerados essenciais e, uma vez que são indispensáveis para nosso metabolismo, devem ser obtidos por meio da alimentação (BYLUND, 1995).

As proteínas presentes no soro lácteo constituem uma importante fonte para obtenção de aminoácidos essenciais, cumprindo as exigências qualitativas e quantitativas requeridas pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde (WHO) (SGARBIERI, 1996; BALDASSO, 2008).

Adicionalmente, essas proteínas vêm apresentando uma série de aplicações na indústria alimentícia, como, por exemplo, sopas desidratadas, molho para saladas,

alimentos dietéticos, sorvetes, queijos, produtos de panificação, confeitarias, iogurtes, bebidas lácteas e como suplemento alimentar (SGARBIERI, 1996).

Além disso, por serem facilmente digeridas e absorvidas pelo organismo, contribuem para a síntese de proteínas sangüíneas e teciduais. Adicionalmente, são classificadas como proteínas de metabolização rápida, sendo úteis para situações emergenciais de reposição de proteínas (SGARBIERI, 1996).

Para efeitos de comparação, apenas 14,5 g de proteínas do soro do leite são capazes de satisfazer as necessidades diárias protéicas de nosso organismo. Para o caso da proteína do ovo, são necessárias 17,4 g, o que evidencia a alta capacidade nutricional das proteínas do soro lácteo (LAGRANGE & DALLAS, 1997).

Praticantes de atividades físicas e portadores de doenças vêm procurando benefícios nesta fonte protéica. Evidências recentes sustentam a teoria de que as proteínas do soro, além de seu alto valor nutritivo, possuem peptídeos bioativos, que atuam como agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, reguladores da função imune, assim como fatores de crescimento e estimulantes do ganho de força muscular por favorecerem o anabolismo (SALZANO, 2002; HARAGUCHI, 2005).

Além das propriedades nutricionais e farmacológicas, as proteínas do soro podem ser empregadas em uma vasta gama de aplicações industriais, em virtude de suas propriedades funcionais, tais como elevada solubilidade em uma ampla faixa de pH, baixa viscosidade, capacidade de adsorção de água, capacidade de gelificação, emulsificação e formação de espuma (YADA, 2004).

2.12 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE

As proteínas consistem nos componentes mais importantes do soro do leite. No entanto, uma vez que estão presentes em baixas concentrações, torna-se necessário o uso de operações de concentração para maximizar as suas propriedades (HUFFMAN, 1996).

Desse modo, pesquisas envolvendo novas tecnologias com o objetivo de concentrar, fracionar e preservar as proteínas do soro lácteo vêm sendo desenvolvidas (BALDASSO, 2008). A Figura 2-19 representa fluxograma para obtenção de proteínas de soro em pó, separando-as dos outros constituintes a partir do leite integral.

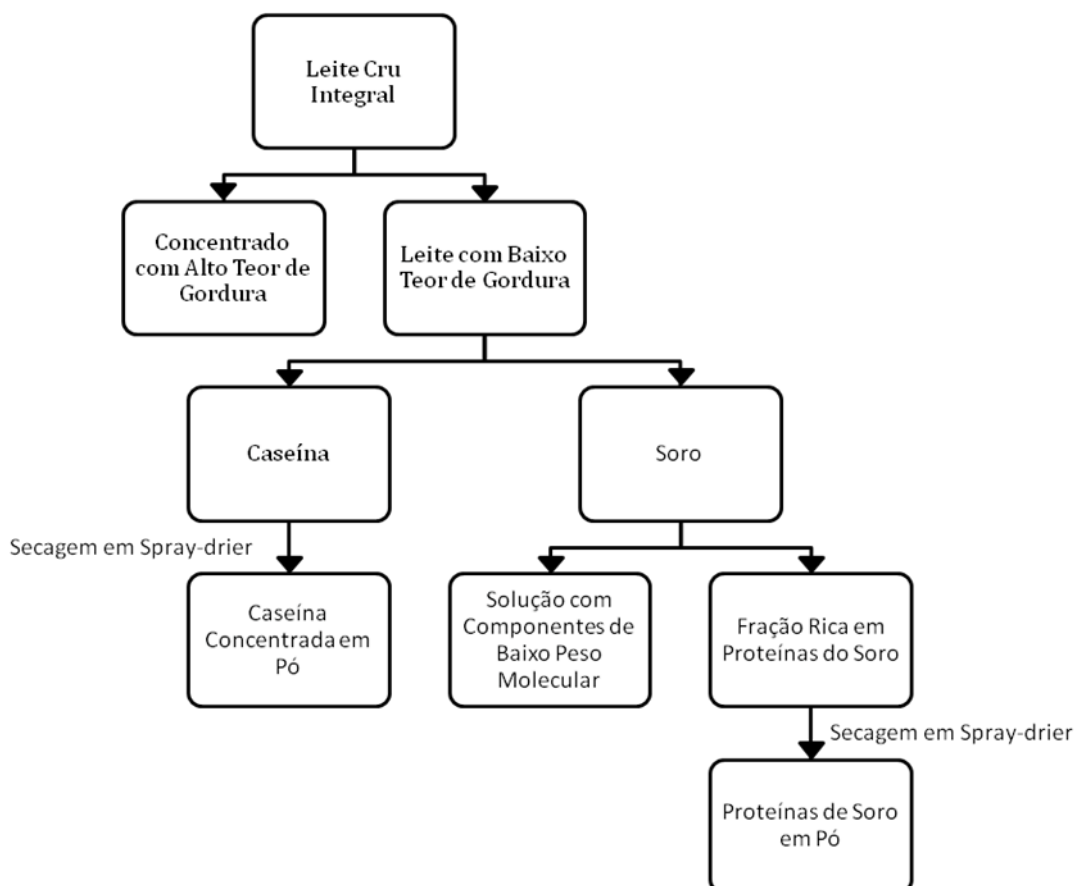


Figura 2-19 – Fluxograma de processo em cascata para separação das proteínas dos outros componentes do soro lácteo

A seguir são descritos os principais métodos utilizados atualmente para obter concentrados protéicos.

2.12.1 DESNATURAÇÃO TÉRMICA

Entre os métodos tradicionais de recuperação de proteínas do soro, pode-se destacar a desnaturação térmica. A coagulação ótima é obtida para pH 6 e temperatura de 90°C, por um intervalo de tempo de 10 a 20 minutos. Após a coagulação, a recuperação das proteínas ocorre por centrifugação, no entanto as proteínas apresentam baixa solubilidade e funcionalidade (FOX & McSWEENEY, 1998 *apud* BALDASSO, 2008).

2.12.2 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

Outra forma de concentração de proteínas do soro do leite consiste na separação por membranas. Muitos estudos vêm sendo conduzidos em processos de microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF), para o fracionamento das proteínas do soro do leite. Além disso, tais processos também têm sido aplicados na remoção de microrganismos lácteos e em sistemas de tratamento de efluentes (OLIVEIRA & PETRUS, 2003; BRANS *et al.*, 2004; SERPA 2005).

Entretanto, apesar da crescente importância dos processos de filtração, existem alguns fatores que causam o declínio do fluxo de permeado, inviabilizando técnica e economicamente o processo, tais como polarização de concentração, *fouling*, bloqueio dos poros e formação de camadas géis (BASSETTI *et al.*, 2003; JAMES *et al.*, 2003; SERPA, 2005). Tais problemas tendem a ser mais graves na ultrafiltração, devido ao menor tamanho dos poros, agravados pelos altos fluxos e baixos coeficientes de transferência de massa (MULDER, 2000 *apud* SERPA, 2005).

2.13 FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE

O fracionamento dos constituintes protéicos do soro é o isolamento ou separação de β -LG e α -LA, BSA, Lactotransferrina, Lactoperoxidase e Imunoglobulinas em frações distintas. Este fracionamento vem sendo cada vez mais estudado, devido às importantes propriedades funcionais e biológicas de cada proteína separadamente, propriedades essas que não são observadas nos concentrados protéicos, em virtude das interações entre as diversas proteínas (BRAMAUD, 1997).

Técnicas de fracionamento patenteadas e registradas estão sendo utilizadas para isolar as duas principais proteínas do soro, β -LG e α -LA, com alto índice de pureza (BALDASSO, 2008).

Na década de 60, as técnicas de fracionamento laboratoriais mais utilizadas consistiam em precipitação, permutação iônica e cristalização. Atualmente, os processos de separação por membranas e cromatografia são os mais empregados (BALDASSO, 2008).

Entre os processos de precipitação, destacam-se a precipitação seletiva e por calor. A precipitação seletiva com agentes complexantes consiste na variação de parâmetros como pH, temperatura e concentração salina, de modo a obter diferentes frações protéicas (ZIDNEY, 1998). Já a precipitação por calor, permite recuperar a β -LG por ultrafiltração, o que não acontece com a α -LA devido à baixa densidade (OUTINEN *et al.*, 1996; BALDASSO, 2008).

Uma propriedade diferenciadora da α -LA em relação à β -LG consiste na baixa solubilidade para pH ácido, de 3,5 a 4,5. A precipitação por acidificação de soro utiliza essa propriedade para segregar essas proteínas, mantendo a β -LG em solução, enquanto a α -LA se precipita (LUCENA *et al.*, 2007).

Em estudos de precipitação por acidificação, foi possível isolar tais proteínas utilizando-se ajuste de pH e temperatura (3,9 e 55°C, respectivamente). A separação foi consolidada com o auxílio de centrifugação. Como resultado, a fase solúvel passou a ser constituída por β -LG, lactose e minerais, enquanto o precipitado consistia de α -LA, BSA, Ig (BRAMAUD, 1997; BALDASSO, 2008).

Já com o emprego de micro e ultrafiltração, técnicas bastante estudadas atualmente, utiliza-se o tamanho das partículas como propriedade diferenciadora. Com separação por membranas foi relatado índice de purificação de 90% de β -LG em estudos de misturas binárias com α -LA (CHEANG & ZIDNEY, 2004).

O uso de cromatografia de permeação em gel ou por colunas, por sua vez, apresenta notável viabilidade técnica, permitindo o fracionamento das proteínas,

possuindo, entretanto, limitações do ponto de vista financeiro (YADA, 2004). Já a cromatografia de troca iônica é capaz de fornecer um alto índice de purificação, em escala industrial. Nesse processo, as proteínas adsorvem-se à coluna de troca iônica e são eluídas com o ajuste de pH. Utiliza-se osmose reversa para retirar os sais, sendo o produto seco em spray drier (BOBRESHOVA *et al.*, 2002; BALDASSO, 2008).

CAPÍTULO 3: METODOLOGIA

O procedimento experimental desenvolvido neste trabalho pode ser dividido em quatro partes principais. A primeira parte consistiu na síntese de géis poli(N-isopropilacrilamida) com diferentes concentrações de monômero e agente reticulante. Na segunda parte dos experimentos, o comportamento de expansão desses géis em água foi avaliado, a partir do cálculo do grau de expansão mássico (GEM) dos géis em diferentes temperaturas. Já na terceira parte do trabalho, foram estudadas as propriedades dos géis sintetizados por meio de análise térmica. Por fim, na quarta parte, dois dos géis obtidos foram utilizados para o estudo da concentração das proteínas presentes no soro do leite.

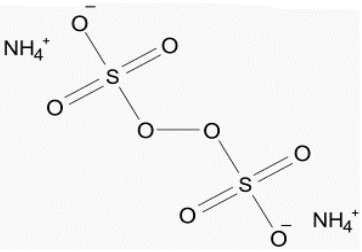
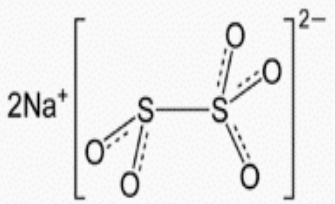
3.1 SÍNTESE DOS GÉIS DE N-ISOPROPILACRILAMIDA

A síntese dos géis PNIPAAm foi feita à temperatura de 10°C, em solução aquosa, e atmosfera inerte de nitrogênio. Como a reação ocorre via radical livre, a atmosfera inerte é fundamental para a síntese, uma vez que a presença de oxigênio no sistema inibe esse tipo de reação. Os parâmetros de síntese utilizados foram analisados por Silva Filho (2005).

O monômero utilizado foi o N-isopropilacrilamida (SIGMA-ALDRICH), que, por ser bifuncional, promove o crescimento linear das cadeias poliméricas. A interligação das cadeias foi feita com o agente reticulante tetrafuncional N,N'-Metilenobisacrilamida (MBAAm) (SIGMA-ALDRICH). Os dois iniciadores utilizados

foram o Persulfato de Amônio (AP) (VETEC) e Metabissulfito de Sódio (SM) (SIGMA-ALDRICH). Esses reagentes estão compilados na Tabela 3-1.

Tabela 3-1 – Reagentes utilizados na síntese de Géis poli(N-isopropilacrilamida)

Material	Função	Estrutura	Massa Molecular (g/gmol)
N-isopropilacrilamida (NIPAAm)	Monômero	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2 = \text{CH} \\ \\ \text{C} \\ // \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{NH} \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array} $	113,6
N,N-Metilenobisacrilamida (MBAAm)	Reticulante	$ \left[\begin{array}{c} \text{CH}_2 = \text{CH} \\ \\ \text{C} \\ // \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{NH} \end{array} \right]_{\text{CH}_2} 2 $	154,17
Persulfato de Amônio (AP)	Iniciador		228,2
Metabissulfito de Sódio (SM)	Iniciador		190,1

De acordo com a notação descrita por Hjerten em 1962 (HJERTEN, 1962), em relação à composição monomérica, um gel polimérico pode ser identificado por um par numérico AxB. O primeiro termo, A, corresponde à massa total de monômero e reticulante, em porcentagem massa/volume. A massa total engloba tanto o

monômero principal quanto o agente reticulante. Já o segundo termo, B, se refere à quantidade de agente reticulante em porcentagem massa/massa em relação à massa total de monômero. Dessa forma, os géis foram sintetizados nas seguintes proporções de monômero/reticulante: 10x1; 10x2; 10x4; 10x5; 10x6; 12x1; 13x1; 14x1; 15x1, 20x1 e 20x5.

A quantidade de iniciador utilizada para a síntese foi de 0,5% do peso total de cada gel. As proporções monômero/reticulante e quantidades de iniciador utilizadas na síntese de cada sistema encontram-se na Tabela 3-2.

Tabela 3-2 – Proporções monômero/reticulante e quantidades de iniciador utilizadas na síntese de géis PNIPAAm para 20 mL de solução

Gel	Monômero	Reticulante	Iniciador 1	Iniciador 2
	NIPAAm (g)	MBAAm (g)	AP (g)	SM (g)
10 x 1	1,980	0,020	0,010	0,010
10 x 2	1,960	0,040	0,010	0,010
10 x 4	1,920	0,080	0,010	0,010
10 x 5	1,900	0,100	0,010	0,010
10 x 6	1,880	0,120	0,010	0,010
12 x 1	2,376	0,024	0,012	0,012
13 x 1	2,574	0,026	0,013	0,013
14 x 1	2,772	0,028	0,014	0,014
15 x 1	2,970	0,030	0,015	0,015
20 x 1	3,960	0,040	0,020	0,020
20 x 5	3,800	0,200	0,020	0,020

As quantidades de monômero e de reticulante necessárias foram pesadas em uma balança analítica (METTLER AE200). Posteriormente, o reticulante foi transferido para um béquer de 100mL, ao qual foram adicionados 5mL de água Milli-Q plus (MILLIPORE CORPORATION, USA), sendo a solução agitada com agitador magnético até sua total dissolução.

Mantendo-se a agitação, adicionou-se o monômero à solução até esse ser completamente dissolvido. O volume foi então completado até se obter 20mL de solução. Após completa homogeneização, a solução obtida foi transferida para um tubo de ensaio devidamente rotulado.

Feito isso, o tubo de ensaio foi introduzido em banho ultratermostático (QUIMIS) a 10°C. O sistema foi borbulhado com nitrogênio durante 5 minutos, sendo então adicionado o primeiro iniciador (AP). Novamente, borbulhou-se nitrogênio por mais 5 minutos, adicionando-se, após esse tempo, o segundo iniciador (SM). Após a adição do último reagente, o borbulhamento foi mantido por mais 5 minutos, sendo o tubo de ensaio fechado e mantido no banho ultratermostático por 24h, até o término da reação de polimerização.

Completada a síntese, os géis foram retirados do recipiente, com a ajuda de uma espátula, lavados com água Milli-Q plus, cortados em cubos com auxílio de uma espátula e colocados em um vidro de relógio, que foi introduzido em estufa à vácuo digital (VACUOTERM 6030A) à 60°C, para secagem.

Após 24 horas, os pedaços de géis secos foram colocados em recipientes de vidro, devidamente etiquetados e guardados em local com baixa umidade.

3.2 MEDIDAS DO GRAU DE EXPANSÃO MÁSSICO

Após a secagem dos géis PNIPAAm na estufa, determinou-se o grau de expansão mássico desses. Para isso, aproximadamente 0,5g de gel 10x1 foi pesado e transferido para recipiente de vidro com tampa. A esses recipiente foram adicionados 50mL de água Milli-Q plus. O recipiente foi, então, colocado em um banho ultratermostático à 5°C para que ocorresse a expansão.

Após 24 horas, tempo considerado suficiente para que o gel atingisse o equilíbrio de expansão, o recipiente foi retirado do banho, sendo o gel separado da solução por peneiramento e novamente pesado.

Esse procedimento foi repedido mais oito vezes para temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 45 e 55 °C.

Com as massas dos géis secos e expandidos, o grau de expansão mássico foi calculado, o que permite determinar o comportamento do gel polimérico termossensível em água.

De forma similar, esse procedimento foi repetido para obtenção do grau de expansão dos géis 10x2; 10x4; 10x5; 10x6; 12x1; 13x1; 14x1; 15x1, 20x1 e 20x5.

3.3 ANÁLISE TÉRMICA

No presente trabalho, a calorimetria exploratória diferencial foi usada para verificar as temperaturas de transição vítrea (T_g) e de degradação (T_d) dos géis de

PNIPAAm. A estabilidade térmica dos géis sintetizados e a degradação dos mesmos foram investigadas por termogravimetria (TG).

Dentre os géis sintetizados, foi escolhido para a análise térmica o gel 10x1, por ser um gel considerado referência, cuja estrutura, estabilidade térmica e mecanismo de degradação já estão bem descritos. O gel 10x6 foi escolhido por apresentar maior quantidade de reticulante em sua estrutura em relação ao gel 10x1. Por sua vez, o gel 20x1 foi escolhido por possuir maior quantidade de monômero em relação ao 10x1.

3.3.1 DETERMINAÇÃO DAS TEMPERATURAS DE TRANSIÇÃO VÍTREA E DE DEGRADAÇÃO VIA CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Para a determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) e da temperatura de degradação (T_d), utilizou-se equipamento DSC 50 SHIMADZU, acoplado a um analisador térmico Shimadzu TA-501. Primeiramente, amostras de cada um dos géis secos passaram por um processo de tratamento térmico para retirada de umidade.

O procedimento para o tratamento térmico foi realizado no próprio equipamento de DSC com as seguintes condições: massa de 5,0 a 10,0mg de gel, faixa de temperatura da varredura de $T_{ambiente}$ a 100°C , mantendo-se a 100°C por 30 minutos e taxa de aquecimento de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Os géis secos, previamente lavados e cortados, foram colocados em células de alumínio seladas. O fluxo de nitrogênio seco foi fixado em $20\text{mL}/\text{min}$.

Após 30 minutos a temperatura de 100°C, a amostra foi resfriada naturalmente até a temperatura ambiente e novamente pesada, para, logo em seguida, ser submetida à nova análise no DSC para determinação de T_g e T_d .

Então, a análise no DSC foi feita com razão de aquecimento de 20°C/min, atmosfera de nitrogênio seco com fluxo de 20mL/min, faixa de T_{ambiente} até 500°C, uma célula de alumínio contendo a amostra e outra vazia como referência.

3.3.2 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE E DEGRADAÇÃO TÉRMICA VIA TERMOGRAVIMETRIA (TG)

A análise de termogravimetria foi realizada em equipamento Shimadzu TGA-50 para verificar a variação de massa com o aumento da temperatura e a degradação térmica dos géis. Primeiramente, realizou-se uma corrida inicial em célula de platina, a uma taxa de aquecimento de 20°C/min, de T_{ambiente} até 100°C, atmosfera de nitrogênio seco, com fluxo de 20mL/min, com intuito de retirar umidade e impurezas voláteis. Posteriormente, realizou-se o teste, à mesma taxa de aquecimento, de T_{ambiente} até 600°C, em célula de platina e atmosfera de nitrogênio seco a uma vazão de 20mL/min.

3.4 PREPARAÇÃO DO SORO DO LEITE

O soro doce, em pó desnatado, proveniente da fabricação de queijo, utilizado neste trabalho foi doado pela empresa Sooro (Marechal Cândido Rondon, Paraná).

Utilizou-se soro em pó por ser a forma mais estável e homogênea do soro do leite, contendo todos os constituintes nas mesmas proporções relativas ao soro original. Além disso, pode ser armazenado por um tempo maior (12 meses) sem danos às suas propriedades físicas ou nutricionais, minimizando, dessa forma, o fator microbiológico e reduzindo os custos de transporte e armazenamento.

As características físico-químicas do soro, retiradas da especificação técnica do fabricante, estão representadas na Tabela 3-3. Já as informações nutricionais e os parâmetros microbiológicos podem ser visualizados, respectivamente, na Tabela 3-4 e na Tabela 3-5.

Tabela 3-3 – Parâmetros Físico-Químicos do Soro de Leite em Pó - Sooro

Parâmetros Físico-Químicos	
Umidade	Máximo 3%
Acidez (ácido láctico)	Máximo 2,0% ¹
Gordura	Máximo 1,5%
Insolubilidade	Máximo 1 mL
pH (solução 10%)	6,0 – 7,0
Cinzas (sais minerais)	Máximo 6%
Proteínas	Mínimo 10%*
Lactose	75 - 78%*
Cloretos (NaCl)	Máximo 1,9%

¹ Método C – IN 68/2006 – MAPA

*Percentual mássico

Tabela 3-4 – Informações Nutricionais do Soro de Leite em Pó – Sooro

Informações Nutricionais – Porção de 100 g	
Calorias	360 kcal
Carboidratos	78 g
Proteínas	11 g
Gorduras Totais	1,0 g
Gorduras Saturadas	0,5 g
Gorduras Trans	0,0 g
Colesterol	6 mg
Cálcio	675 mg
Ferro	0,90 mg
Sódio	630 mg

Tabela 3-5 – Parâmetros Microbiológicos do Soro de Leite em Pó – Sooro

Parâmetros Microbiológicos	
Aeróbios Mesófilos	Máx 5×10^4 UFC/g
Coliformes Totais	Máx 1×10^2 UFC/g
Coliformes Fecais	Máx 1×10^1 UFC/g
St. Aureus	Máx 1×10^2 UFC/g
Bolores e Leveduras	Máx 5×10^1 UFC/g
Salmonella (25g)	Ausente*
Bacillus cereus	Máx 1×10^3 UFC/g

* Análise semestral

Para a realização dos experimentos, o soro em pó foi reconstituído por meio de dissolução manual em água Milli-Q plus na temperatura ambiente. Para isso, foram pesados 0,5g de soro em balança analítica. A massa de soro foi colocada em um béquer, contendo 10mL de água, e, então, agitada com um bastão de vidro. Após obter uma boa dissolução, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 50mL, tendo seu volume aferido. Assim, a solução foi agitada manualmente, sendo conservada em geladeira.

Na etapa de concentração do soro, o volume inicial a ser concentrado foi de 50mL, contendo 0,5g soro em 50mL de solução.

3.5 PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE UTILIZANDO GEL TERMOSENSÍVEL

Os géis PNIPAAm 20x5, após serem retirados secos da estufa, foram colocados em contato com o soro durante vinte e quatro horas, a diferentes temperaturas. Ao expandir, o gel absorveu grande parte da água, lactose e sais, moléculas de baixo peso molecular. O soro resultante, mais concentrado em proteínas, foi então separado do gel expandido, por meio de peneiramento, sendo armazenado para possíveis reutilizações. O gel expandido, por sua vez, foi submetido a um processo de recuperação, que consistiu na elevação da temperatura a 60°C, durante 24 horas, resultando na contração do gel, com conseqüente liberação das moléculas absorvidas.

Entre os principais fatores capazes de alterar a eficiência de extração, destacam-se a relação massa de gel/volume de soro, a temperatura do experimento, a estrutura do gel sintetizado e o número de ciclos utilizados no processo. A metodologia para avaliação da influência desses parâmetros na eficiência de extração será discutida nos subitens subseqüentes.

3.5.1 ESTUDO DAS RELAÇÕES MASSA DE GEL/VOLUME DE SORO

Os experimentos descritos a seguir tiveram por objetivo mostrar a influência das relações massa de gel/volume de soro (R) sobre as eficiências de extração, com intuito de determinar uma relação R otimizada para o processo em questão.

Para isso, adicionou-se 0,5g de gel 20x5 a 50mL de solução de soro reconstituído, contendo 0,5g de soro em pó. A solução foi mantida por 24 horas a uma temperatura de 5°C, em banho termostático. Feito isso, a solução, juntamente com o gel, foi peneirada, separando-se em solução passante e gel. O procedimento foi repetido, variando-se apenas a quantidade de gel, para os valores de 1,0g, 1,5g e 2,0g. A solução passante, concentrada em proteínas, foi armazenada em recipiente de vidro, para posterior dosagem de proteínas.

Já o gel, retido durante o processo de peneiramento, foi, para todos os experimentos, transferido para um béquer, contendo água, e aquecido a 60°C, para contração e conseqüente liberação das moléculas presentes em seu interior. Posteriormente, para a lavagem do gel, esse, ainda contraído, foi transferido para um béquer contendo 50mL de água Milli-Q e deixado em repouso para expandir, durante 24h. Após essa lavagem, o gel expandido, foi secado em estufa, a 60°C por 24 horas.

3.5.2 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

Posteriormente, para estudo da influência da temperatura na eficiência de extração, realizou-se o procedimento acima descrito, com as mesmas proporções de massa

de gel 20x5 para volume de soro, variando-se apenas a temperatura, que antes era de 5°C, para 20°C.

A solução passante foi também armazenada em recipiente de vidro, sendo posteriormente destinada ao mesmo método de dosagem de proteínas. Adicionalmente, foi empregado o mesmo método para recuperação do gel, visando sua reutilização.

3.5.3 ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE SEPARAÇÃO COM A UTILIZAÇÃO DE GÉIS COM DIFERENTES PROPORÇÕES MONÔMERO/RETICULANTE

Foi empregado o mesmo procedimento descrito no item 3.5.1, utilizando 2g de gel. No entanto, com o intuito de se analisar a influência do tipo de gel sobre a eficiência de extração, trabalhou-se com o gel 10x1. Dessa forma, foram realizados dois experimentos, um a 5°C e outro a 20°C em banho termostático, nos quais 2g de gel 10x1 foram colocados em contato com soluções de 50 mL, contendo 0,5 g de soro cada uma, durante 24 horas.

3.5.4 PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO EM CICLOS DE SEPARAÇÃO

Para a simulação da concentração das proteínas do soro em ciclos de separação, considerou-se massa inicial de 20L de solução de soro, com concentração 1,712g/L de proteína. 1kg de gel 20x5 foi adicionado. Após expansão a 5°C, por 24 horas, o soro foi separado da solução mais concentrada. A esta solução foram adicionados 0,5kg de gel 20x5. Após expansão a 5°C, por 24 horas, o soro foi separado da

solução mais concentrada. O procedimento foi repetido contactando-se com a solução cada vez mais concentrada, sucessivamente, 0,25; 0,125 e 0,0625kg de gel 20x5. A simulação dos ciclos de concentração foi feita considerando-se eficiência de separação de 100%.

Para avaliar a influência da massa de gel nas concentrações obtidas em ciclos de separação, o procedimento foi repetido partindo-se de 0,5kg de gel 20x5, considerando-se eficiência de separação de 100%. Assim, sucessivamente, acrescentou-se 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,03125kg de gel, conforme Figura 3-1.

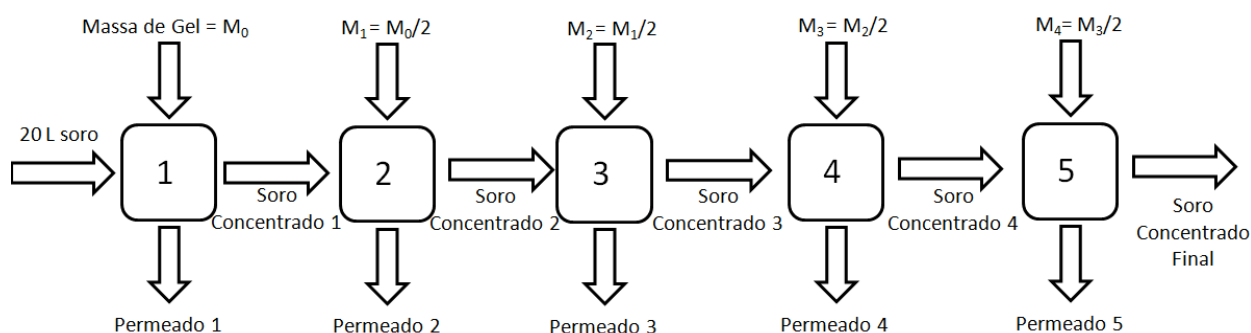


Figura 3-1 – Representação esquemática do processo de concentração em ciclos via gel termossensível

O processo de concentração em ciclos foi simulado em corrente cruzada, uma vez que os géis não foram reutilizados, ou seja, em cada ciclo eram adicionados géis novos à solução.

3.6 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL

A quantidade total de proteína nas amostras do concentrado e do permeado foi determinada, em triplicata, pelo método de Lowry modificado (Lowry-BCA), utilizando

o Kit da BioAgency. O princípio do método baseia-se na redução do Cobre ($\text{Cu}^{+2} \rightarrow \text{Cu}^{+1}$) pela proteína em um meio alcalino, combinada com a alta sensibilidade e seletividade da detecção colorimétrica do cátion de cobre (Cu^{+1}) utilizando um reagente único contendo ácido bicincôninico (BCA). A coloração púrpura resultante da reação é formada pela interação de duas moléculas do reagente BCA com um íon de cobre (Cu^{+1}). Este complexo solúvel em água exibe uma alta absorvância à 562nm com resultados aproximadamente lineares, permitindo a quantificação de proteínas na faixa de 2 - 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ quando medidas em um espectrofotômetro ou leitor de microplacas.

Primeiramente, prepararam-se cinco soluções com concentração conhecida da proteína BSA (1; 10; 25; 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A cada solução foram adicionados 200,0 μL de uma mistura dos reagentes A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicincôninico e tartarato de sódio em 0,1mol L^{-1} de hidróxido de sódio) e B (sulfato de cobre 4%). Para cada dosagem de proteínas foram utilizadas 25,0 μL de amostra contendo o extrato protéico e 200,0 μL da mistura dos reagentes A e B.

A placa de 96 poços contendo as amostras e os padrões de BSA foi agitada vagarosamente por 30 segundos e incubada por 30 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro Hach, modelo DR4000, sendo as absorvâncias determinadas a $\lambda = 562 \text{ nm}$.

As concentrações de proteína foram determinadas por interpolação dos valores obtidos na curva analítica preparada com padrão de proteína BSA.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo visa apresentar e discutir os resultados obtidos, dando enfoque à obtenção dos géis de PNIPAAm, ao estudo do grau de expansão mássico desses, à caracterização por análise térmica e à concentração das proteínas do soro do leite.

4.1 OBTENÇÃO DOS GÉIS DE POLI(N-ISOPROPILACRILAMIDA)

Os géis sintetizados apresentaram, no geral, consistência firme e coloração transparente. A gelificação de todos os sistemas ocorreu em tempos variados, conforme estudo de Silva Filho (SILVA FILHO, 2005). Com 24 horas de síntese, tempo decorrido após fechamento dos tubos de ensaio e sua colocação no banho ultratermostático, todos os sistemas haviam gelificado. Este tempo relativamente longo foi para garantir a incorporação adicional de monômeros após o ponto gel, minimizando-se a quantidade de monômeros residuais. Após a secagem, as partículas de gel tornavam-se opacas, indicando a ocorrência de separação de fases, com conseqüente formação de agregados poliméricos ('clusters').

Géis sintetizados com maior quantidade de monômeros totais e/ou de reticulante, como o 10x6 e o 20x5, apresentaram-se mais quebradiços. Tal característica pode ser explicada pela maior rigidez desses sistemas. Quando se aumenta a concentração de monômeros totais na síntese, tem-se cadeias mais longas, portanto, mais entrelaçadas e, como conseqüência, mais rígidas. Maior

concentração de reticulante, desde que se traduza em maior densidade de ligações cruzadas, também leva a géis mais rígidos.

4.2 MEDIDAS DO GRAU DE EXPANSÃO MÁSSICO

O estudo do comportamento de expansão de diferentes hidrogéis em condições de diferentes temperaturas permite analisar os tipos de interações existentes entre polímero-polímero e polímero-solvente, responsáveis pelo valor do grau de expansão no equilíbrio de fases.

Para se determinar o grau de expansão mássico dos géis sintetizados, esses foram colocados em banhos termostáticos, sendo mantidos por 24 horas para expandir em temperaturas que variaram entre 5 e 55°C.

Os graus de expansão de cada tipo de gel para cada temperatura se encontram na Tabela 4-1.

Tabela 4-1 - Valores do GEM para os géis em função da temperatura

Géis	GEM								
	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	45°C	55°C
12x1	38,945	34,500	29,182	26,114	21,458	15,494	3,370	2,162	1,948
13x1	26,207	24,359	22,046	19,526	16,842	12,984	4,424	3,003	2,714
14x1	32,222	28,255	24,798	22,126	18,974	14,070	3,000	2,275	2,202
15x1	25,495	22,710	20,248	17,296	14,876	11,987	2,466	1,883	1,814
20x1	24,651	14,595	18,125	16,049	13,766	10,516	2,454	2,171	1,803
10x1	44,016	39,928	37,595	31,562	27,853	18,729	3,072	2,363	1,928
10x2	24,887	22,950	21,934	18,974	15,805	11,639	2,245	2,046	1,765
10x4	13,894	12,632	11,169	10,339	8,947	6,618	2,824	2,083	2,033
10x5	14,334	12,062	11,014	10,211	8,400	6,698	2,990	2,393	2,089
10x6	10,925	9,292	8,770	7,584	6,574	5,111	2,675	2,190	2,026
20x5	10,671	9,052	7,101	5,028	3,729	3,012	1,903	1,634	1,522

Os dados relacionados ao procedimento e à obtenção do grau de expansão mássico se encontram no Anexo I.

Nas Figuras 4-1 e 4-2 são apresentadas as curvas de expansão mássica em função da temperatura obtidas para os géis 20x5 e 10x1, respectivamente. As curvas de expansão mássica em função da temperatura para os outros géis são apresentadas no Anexo II.

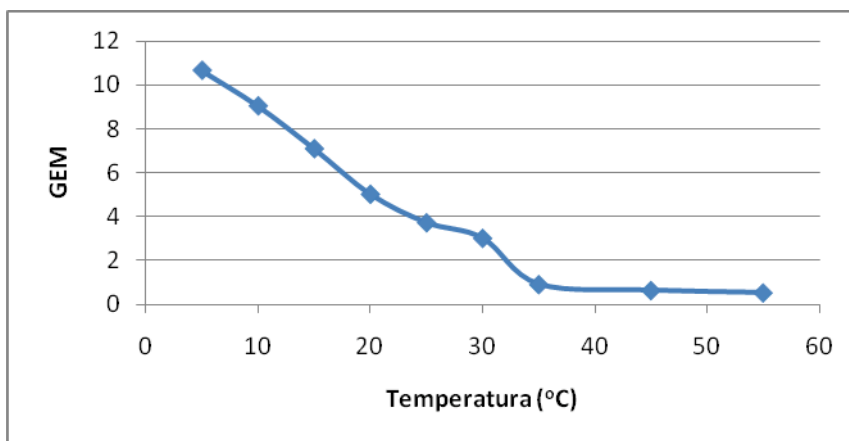


Figura 4-1 - Gráfico de expansão mássica do Gel Poli(N-isopropilacrilamida) 20x5 em função da temperatura

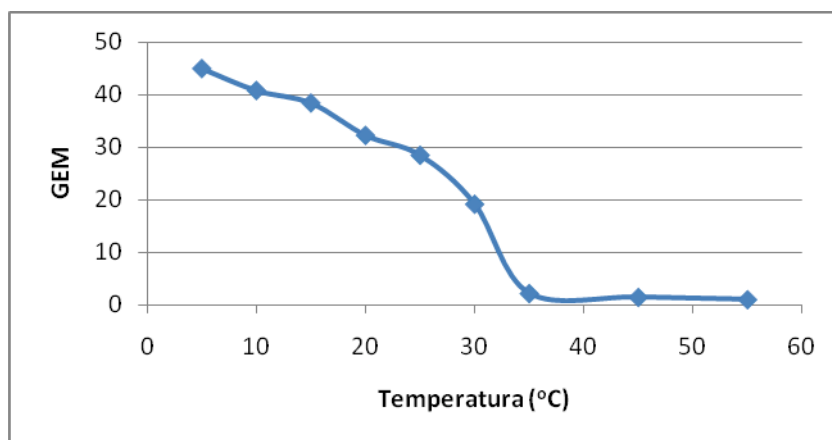


Figura 4-2 - Gráfico de expansão mássica do Gel Poli(N-isopropilacrilamida) 10x1 em função da temperatura

A partir dos gráficos de expansão mássica, conclui-se que os géis PNIPAAm apresentam comportamento análogo a sistemas com LCST e, por isso, em temperaturas mais baixas as interações polímero-solvente são muito favorecidas e os géis expandem mais. Um gel expandido pode ser entendido como um sistema unifásico. Esse grau de expansão vai diminuindo à medida que a temperatura aumenta. A certa temperatura, por volta de 32°C, o comportamento termodinâmico do gel se altera, de forma que as interações polímero-solvente não são mais favoráveis e os valores de GEM são reduzidos drasticamente, o que resulta na contração do gel, com conseqüente expulsão do solvente.

A análise comparativa das Figuras 4.1 e 4.2 permite concluir, ainda, que ambos os géis apresentam uma transição de fases descontínua, ou de primeira ordem, em torno de 32°C, sendo tal transição mais pronunciada para o gel menos rígido (10x1).

Na Figura 4-3 estão apresentados, na forma de gráfico de barras, os valores de GEM obtidos como função da temperatura, para todos os géis sintetizados. As temperaturas utilizadas variaram de 5°C até 55°C, temperatura na qual os valores obtidos de GEM são significativamente pequenos.

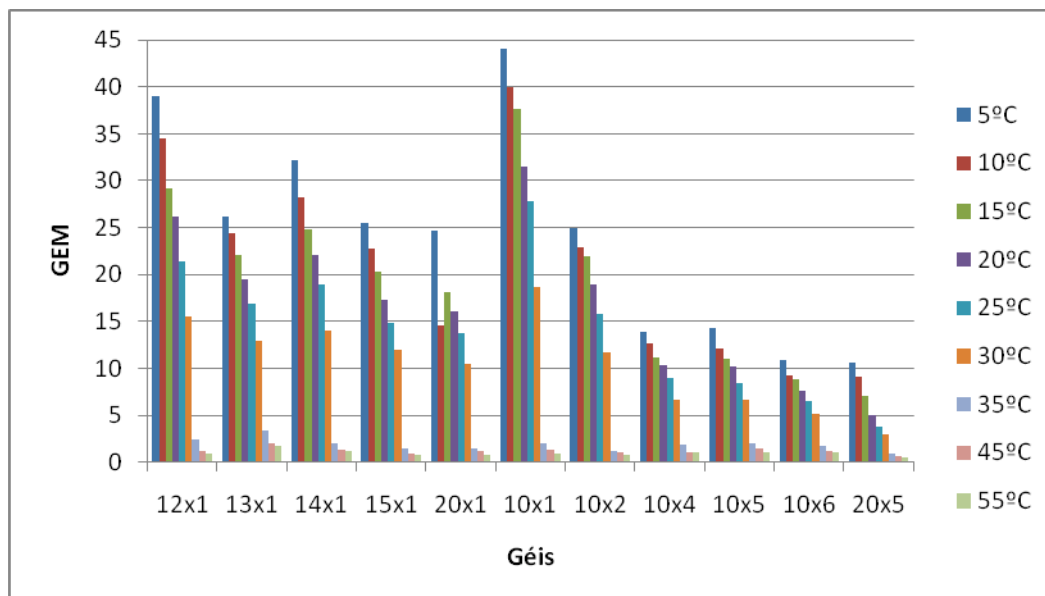


Figura 4-3 – Valores de GEM para os géis a diferentes temperaturas

Dessa forma, a partir do gráfico de barras, notou-se que, para todos os géis analisados, o maior valor de GEM foi obtido a uma temperatura de 5°C. Logo, esse valor ótimo de temperatura foi empregado para a análise dos géis. Assim, a Figura 4-4 apresenta o grau de expansão mássico máximo (à 5°C) dos géis estudados.

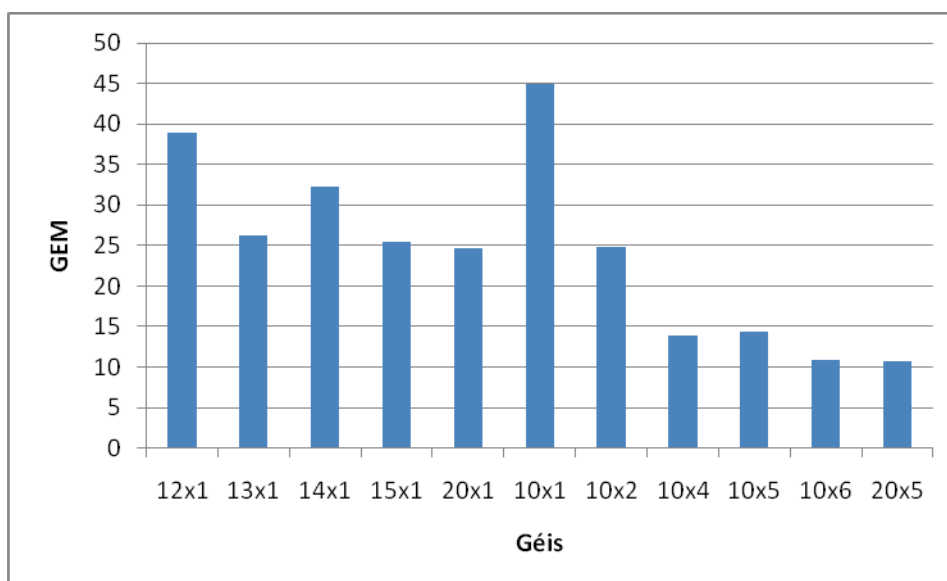


Figura 4-4 – Comportamento de Expansão de Géis PNIPAAm à 5°C

Foi observado que, dentre os géis estudados, o gel 10x1 apresenta o maior grau de expansão à 5°C. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de ser o sistema com menor concentração de monômeros totais e de reticulante, resultando em um gel com menor rigidez, com uma estrutura com maior movimento das cadeias poliméricas, maior abertura dos poros e, conseqüentemente, maior capacidade de absorção de solvente. Termodinamicamente, pode-se entender a expansão do gel como resultado de interações favoráveis polímero-solvente, resultando em um abaixamento da energia livre de mistura. Por outro lado, à medida que o gel se expande, há um aumento da energia livre elástica como resultado da retirada do gel de sua condição de equilíbrio elástico. Sistemas obtidos a partir de uma menor concentração de monômeros apresentam cadeias menos longas, portanto menos susceptíveis ao entrelaçamento, conseqüentemente, menos rígidas. Sistemas obtidos a partir de uma menor concentração de reticulante, traduzida, como já dito, em uma menor densidade de ligações cruzadas, também são menos rígidos. A menor rigidez leva a uma menor oposição à expansão, termodinamicamente entendida como um domínio do termo de mistura sobre o termo elástico.

Corroborando tal linha de análise, o gel 20x5, com elevada concentração de monômeros totais e elevada concentração de reticulante, apresentou o menor grau de expansão mássico, indicando um domínio do termo elástico sobre o termo de mistura.

Portanto, entre os géis analisados, o 10x1 é o que possui a maior capacidade de expansão. No entanto, considerando somente os testes de expansão nada se pode afirmar a respeito de sua seletividade. O gel 20x5, por sua vez, pelo fato de

apresentar um pequeno valor de GEM, tende a ser, teoricamente, o mais seletivo. Os géis 10x1 e 20x5, por apresentarem características antagônicas, foram os escolhidos para serem usados na concentração de proteínas.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS POR ANÁLISE TÉRMICA

Neste item são descritos os resultados obtidos a partir da utilização da calorimetria exploratória diferencial (DSC) para determinação das temperaturas de transição vítrea (T_g) e de degradação (T_d). Além disso, são apresentados e discutidos os resultados referentes à estabilidade e decomposição térmica, obtidos a partir da termogravimetria (TG).

4.3.1 DETERMINAÇÃO DAS TEMPERATURAS DE TRANSIÇÃO VÍTREA E DE DEGRADAÇÃO VIA CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Nas Figura 4-5, Figura 4-6 e Figura 4-7 são apresentadas as curvas DSC para determinação da T_g , obtidas, respectivamente, para os géis de PNIPAAm 10x1, 10x6 e 20x1, na faixa de temperatura de ambiente a 500°C. A partir dessas curvas, determinou-se a T_g , que consiste no ponto médio da primeira mudança abrupta de inclinação da linha base. Já a temperatura de degradação (T_d) consiste na temperatura representada pelo pico do evento térmico das curvas de degradação.

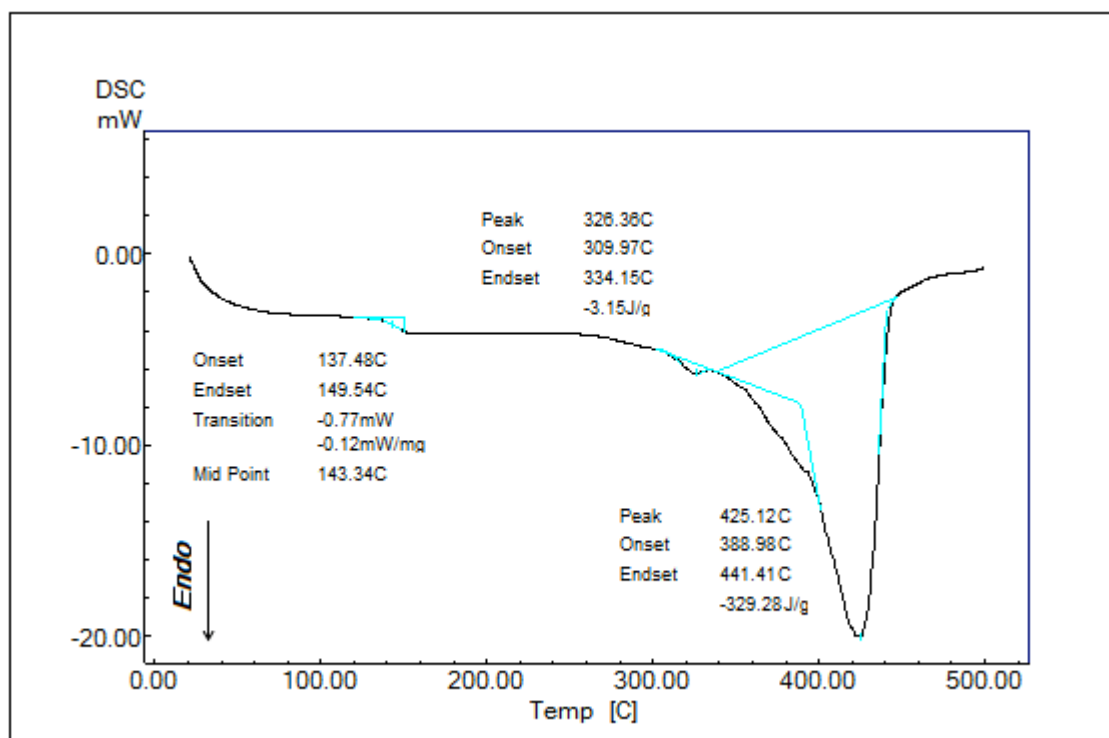


Figura 4-5 - Curva DSC para determinação da T_g e da T_d do gel 10x1

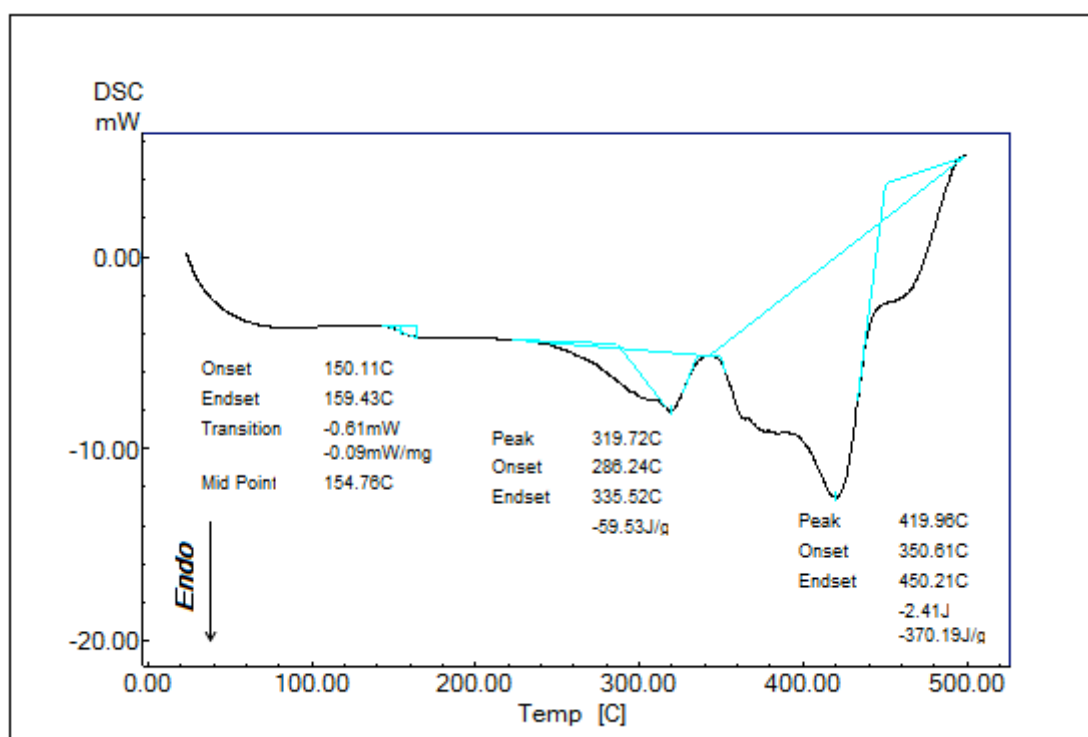


Figura 4-6 – Curvas DSC para determinação da T_g e da T_d do gel 10x6

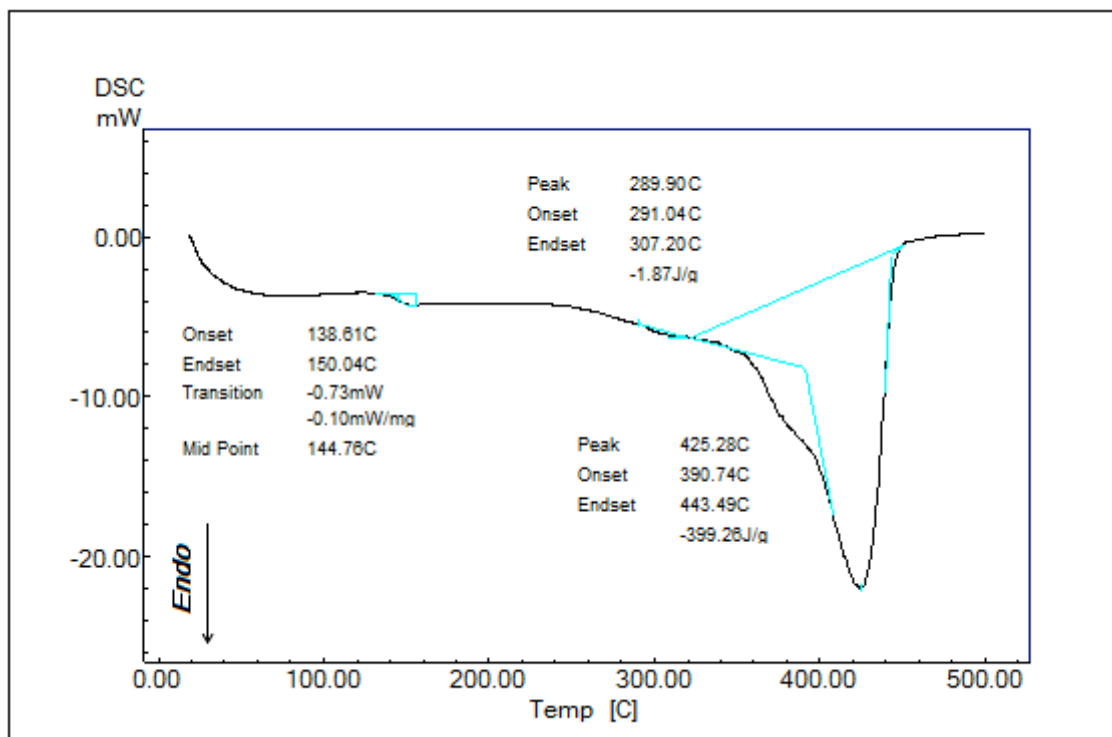


Figura 4-7 - Curva DSC para determinação da T_g e da T_d do gel 20x1

A Tabela 4-2 compila os resultados de T_g , T_d para os dois picos de degradação e variação de entalpia na degradação para os géis analisados via DSC.

Tabela 4-2 - Temperaturas de transição vítrea (T_g), de degradação (T_d) e variação de entalpia para dois picos de degradação determinados via DSC para os géis 10x1, 10x6 e 20x1

	10x1	10x6	20x1
T_g (°C)	143	155	145
T_{d1} (°C)	326	320	290
T_{d2} (°C)	425	420	425
ΔH_1 (J/g)	3	60	2
ΔH_2 (J/g)	329	370	399

A partir das curvas obtidas no DSC, pode-se inferir que a degradação do reticulante ocorreu em temperaturas (T_{d1}) próximas de 300 °C, conforme se pode observar pelo primeiro evento endotérmico, o que justifica o maior valor de variação de entalpia na degradação, ΔH_1 de 60 J/g, observada para o gel 10x6.

Além disso, observou-se que o gel 10x6 possui a maior temperatura de transição vítrea. Isso pode ser explicado devido à maior quantidade de reticulante desse gel, a qual contribui para um maior número de ligações entre as cadeias poliméricas, tornando-o mais rígido, o que dificulta o movimento entre as cadeias.

Comparando-se os géis 10x1 e 20x1, notou-se que ambos os géis apresentam valores bastante próximos para as temperaturas de transição vítrea e de degradação. No entanto, o gel 20x1 apresenta, no segundo evento endotérmico, valor de entalpia de degradação cerca de 21% superior a do gel 10x1. Essa diferença pode ser explicada devido à maior quantidade de monômero presente no gel 20x1, sendo necessária uma maior quantidade de energia para romper sua estrutura.

4.3.2 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE E DEGRADAÇÃO TÉRMICA VIA TERMOGRAVIMETRIA (TG)

A análise termogravimétrica, iniciada a temperatura ambiente, terminou apenas para uma temperatura de 600 °C. A curva da análise termogravimétrica para o gel 10x1 está apresentada na Figura 4-8, enquanto pela Figura 4-9 observa-se o comportamento térmico do gel 10x6. A Figura 4-10, por sua vez, apresenta a curva relativa ao gel 20x1.

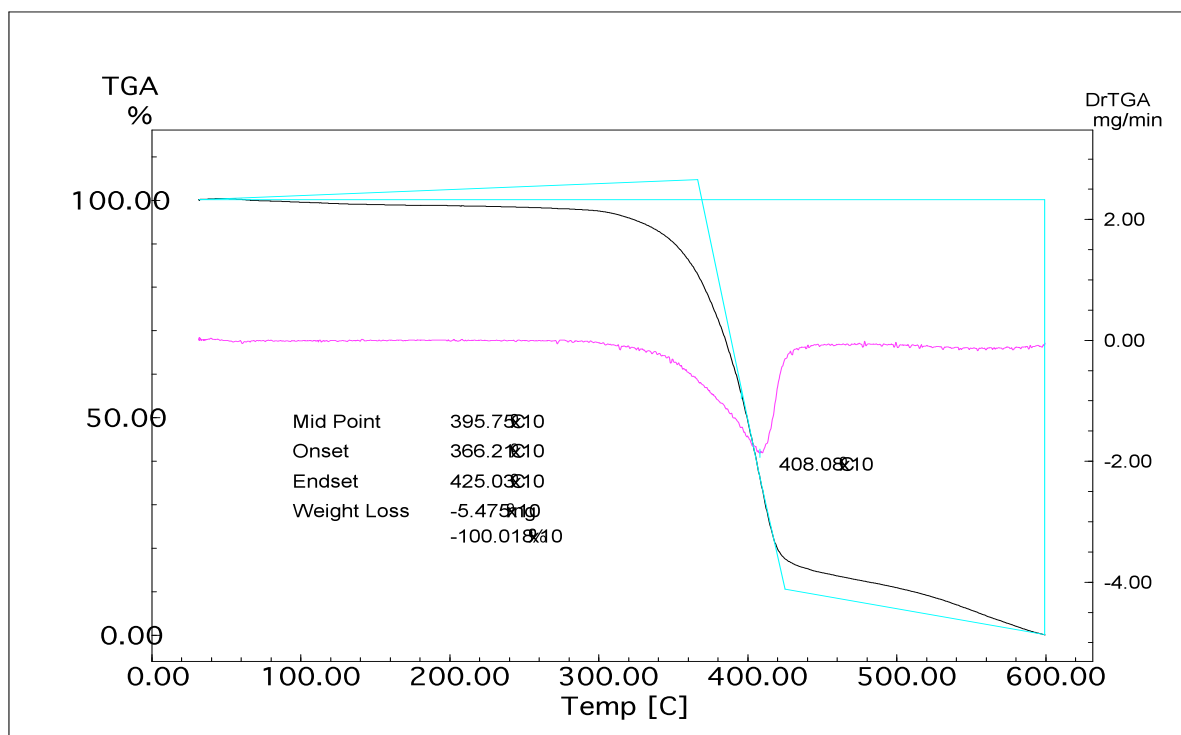


Figura 4-8 - Curvas TG/DTG para o gel 10x1 de temperatura ambiente a 600°C

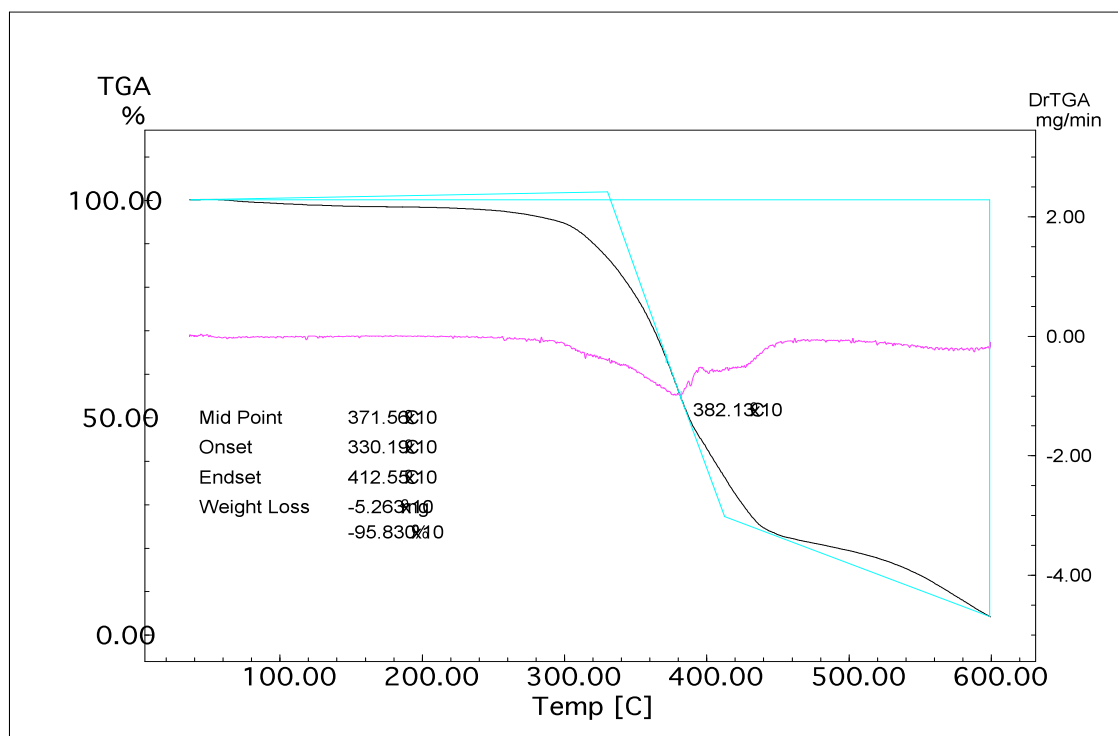


Figura 4-9 - Curvas TG/DTG para o gel 10x6 de temperatura ambiente a 600°C

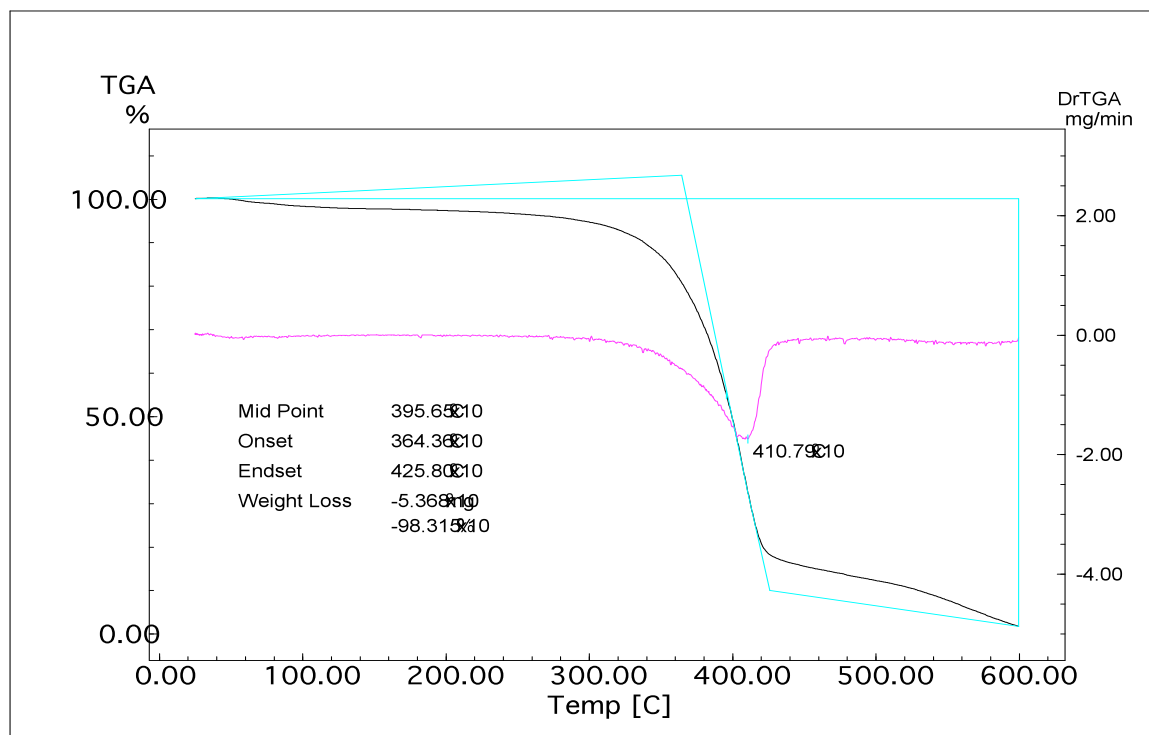


Figura 4-10 - Curvas TG/DTG para o gel 20x1 de temperatura ambiente a 600°C

Os resultados para porcentagem de perda de massa e temperatura de máxima degradação estão resumidos na Tabela 4-3.

Tabela 4-3 – Valores de porcentagem de perda de massa e temperatura máxima de degradação determinados via TG para os géis 10x1, 10x6 e 20x1

Gel	% Perda de massa	T _{máx degradação} (°C)
10x1	100	408
10x6	96	382
20x1	98	411

Como a degradação dos três géis ocorreu em temperaturas elevadas, a partir de 200 °C com T_{máxdegradação} próximas de 400 °C, conclui-se que os géis são estáveis termicamente.

Como se pode observar, os valores de porcentagem de perda de massa para todos os géis foram próximos entre si e próximos a 100%, o que reflete a degradação dos géis. Como os padrões de decomposição são característicos para cada tipo de polímero, os termogramas obtidos podem ser usados como técnica de identificação dos polímeros sintetizados.

4.4 CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE

Após os testes de expansão e análise térmica, foram escolhidos os géis 20x5 e 10x1 para a realização de testes de concentração, visando determinar a seletividade desses géis em soluções de soro do leite, variando-se a relação massa de gel/volume de solução, bem como a temperatura do processo. O gel 20x5 foi escolhido por apresentar, entre todos os géis sintetizados, maior rigidez, resultado das elevadas concentrações relativas de monômeros totais e de agente reticulante. Do ponto de vista do processo proposto para concentração de soluções de macromoléculas, sistemas com essa estrutura tendem a ser mais seletivos, absorvendo espécies de baixa massa molecular, no caso em estudo, água, lactose e sais, e excluindo aquelas de maior massa molecular, no caso em estudo, as proteínas do soro do leite. Para comparação, utilizou-se o gel 10x1, potencialmente menos seletivo que o 20x5 por apresentar uma estrutura menos densa ou com poros maiores, resultado de um menor entrelaçamento das cadeias adicionalmente a uma menor densidade de reticulação.

Os resultados de seletividade foram expressos em termos do parâmetro de eficiência de separação (η), que é a medida do grau de exclusão do soluto, proteína, pelo gel.

A quantidade de proteína total presente em cada amostra de concentrado foi determinada, em triplicata, pelo método de Lowry modificado. A Figura 4-11 mostra uma placa de Elisa exemplificativa contendo amostras (B1 a G10) e os pontos da curva analítica (A_3 a A_{12}) que foram utilizados para a quantificação das proteínas presentes nas amostras. As concentrações de albumina (BSA) para construção da curva analítica foram de 1; 10; 25; 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

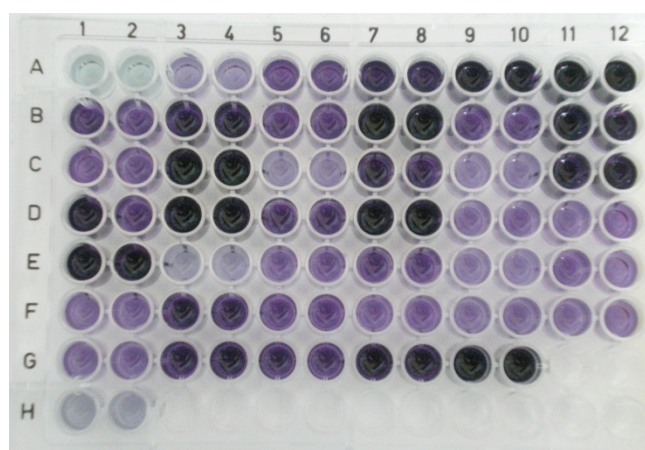


Figura 4-11 – Dosagem de Proteína total pelo Método de Lowry Modificado

A placa de Elisa foi introduzida no espectrofotômetro e foram feitas as medidas de absorbância das amostras e dos padrões. Uma curva analítica de calibração foi construída com as medidas dos padrões relacionando concentração x absorbância e, utilizando-se os parâmetros dessa curva, a concentração de proteína nas amostras foi determinada, conforme demonstrado no Anexo III.

Como o método empregado para quantificação de proteína total é colorimétrico, comparando-se a coloração dos padrões utilizados para construção da curva com as amostras, pôde-se, visualmente, estimar o teor de proteína em cada uma das frações avaliadas.

A concentração média de proteínas totais, obtida pela dosagem em triplicata feita em amostra de 50mL de solução de soro reconstituído, contendo 0,5g de soro, foi de 1,7g/L, conforme Tabela 4-4. Esse valor foi utilizado para comparação e determinação da diferença de concentração entre essa amostra referência e as amostras que entraram em contato com os géis.

Tabela 4-4 – Valores obtidos, média e desvio padrão para a amostra de referência

Valores obtidos (g/L)			Média (g/L)	Desvio Padrão
1,7793	1,6452	1,6911	1,7122	0,0948

4.4.1 ESTUDO DAS RELAÇÕES MASSA DE GEL/VOLUME DE SORO

Com o objetivo de mostrar a influência das relações massa de gel/volume de soro (R) sobre as eficiências de extração, como descrito no subitem 3.5.1 da metodologia, quatro amostras diferentes, cada uma contendo 50mL de solução de soro, foram colocadas em contato, por 24 horas à 5°C, com diferentes quantidades de gel 20x5. As massas de gel utilizadas foram 0,5g, 1,0g, 1,5g e 2,0g. Posteriormente, o processo foi repetido para a temperatura de 20°C.

Após entrar em contato com diferentes quantidades do gel 20x5, a concentração de proteínas para cada amostra (C_f) foi medida e os resultados, em termos de teor de proteína total, estão apresentados na Tabela 4-5 e no Anexo IV.

Tabela 4-5 – Resultados da Dosagem de Proteínas pelo Método de Lowry Modificado para a concentração com a utilização do gel 20x5

Massa Soro (g)	Temperatura (°C)	Massa Gel Seco (g)	$V_{i_{sol}}$ (mL)	R	C_i (g/L)	C_f média (g/L)	Desvio Padrão (g/L)
0,5	5	0,5	50	0,01	1,712	1,890	± 0,041
0,5	5	1	50	0,02	1,712	1,911	± 0,060
0,5	5	1,5	50	0,03	1,712	2,140	± 0,107
0,5	5	2	50	0,04	1,712	2,166	± 0,053
0,5	20	0,5	50	0,01	1,712	1,834	± 0,073
0,5	20	1	50	0,02	1,712	1,899	± 0,054
0,5	20	1,5	50	0,03	1,712	2,127	± 0,037
0,5	20	2	50	0,04	1,712	2,280	± 0,079

De acordo com a Figura 4-12, nota-se que os valores de concentração final para as soluções que entraram em contato com diferentes quantidades de gel aumentam, para uma mesma temperatura, à medida que aumenta a quantidade de gel adicionado. Quanto maior a relação massa de gel/volume de soro, maior a concentração final obtida, para uma mesma temperatura.

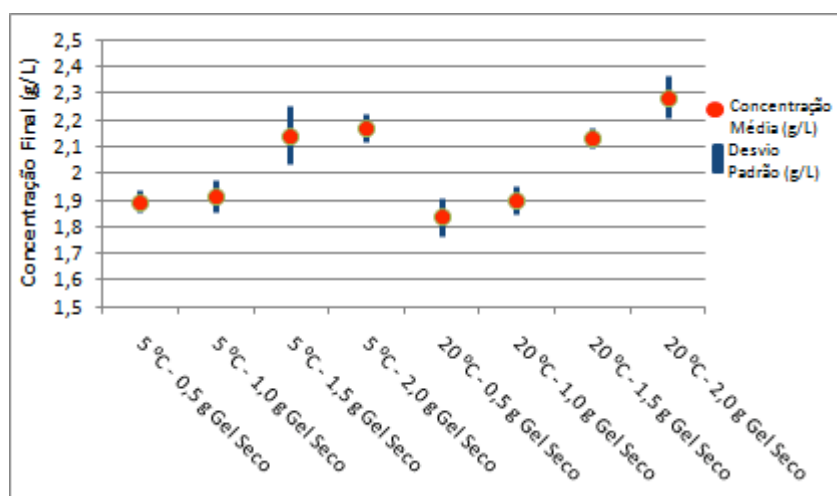


Figura 4-12 – Resultados da Dosagem de Proteínas pelo Método de Lowry Modificado para a concentração com a utilização do gel 20x5

Foram comparados os valores de concentração das soluções concentradas em proteína (C_f) com o valor de concentração de proteína da solução referência de soro (C_i), que não entrou em contato com o gel, obtendo-se as porcentagens de aumento de concentração apresentadas na Tabela 4-6 e na Figura 4-13.

Tabela 4-6 – Porcentagem de diferença de concentração de proteínas entre as soluções concentradas e a referência de soro do leite.

Massa Soro (g)	Temperatura (°C)	Massa Gel Seco (g)	C_i (g/L)	C_f (g/L)	% Aumento de concentração média	Desvio Padrão (%)
0,5	5	0,5	1,712	1,890	10,394	± 2,415
0,5	5	1,0	1,712	1,911	11,615	± 3,483
0,5	5	1,5	1,712	2,140	24,957	± 6,225
0,5	5	2,0	1,712	2,166	26,488	± 3,073
0,5	20	0,5	1,712	1,834	7,108	± 4,250
0,5	20	1,0	1,712	1,899	10,915	± 3,172
0,5	20	1,5	1,712	2,127	24,214	± 2,180
0,5	20	2,0	1,712	2,280	33,182	± 4,630

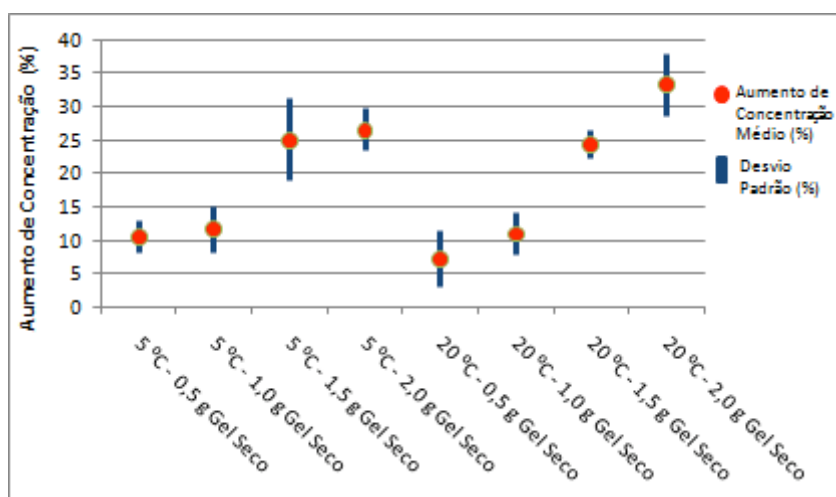


Figura 4-13 – Resultados da Dosagem de Proteínas pelo Método de Lowry Modificado para o aumento de concentração com a utilização do gel 20x5

Observou-se que quanto maior a relação massa de gel/volume de soro, maior o aumento de concentração em proteínas da solução com a utilização do gel. Assim,

conforme a Figura 4-14, notou-se que maiores aumentos de concentração foram encontrados para a maior massa de gel, no caso 2g.

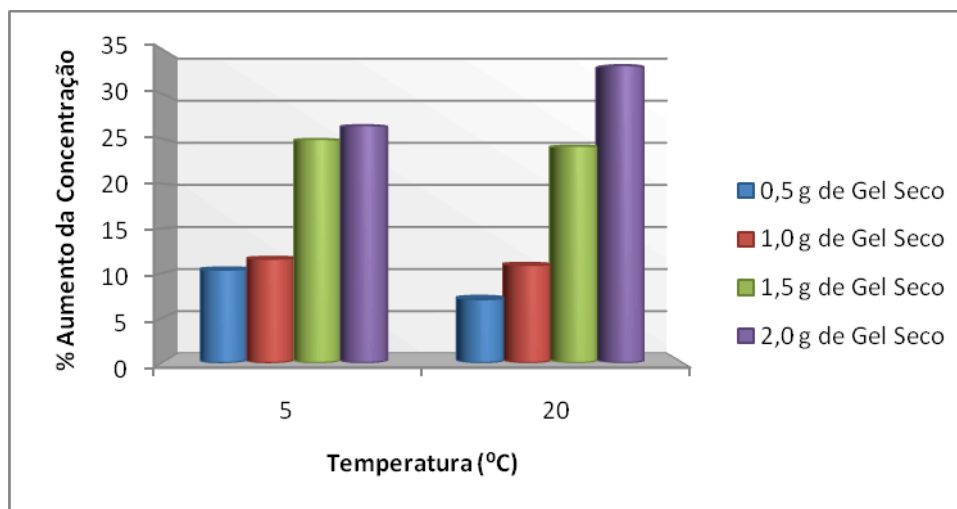


Figura 4-14 - Análise da Influência da Massa de Gel na Concentração de Proteínas

A partir dos resultados apresentados, observa-se que o gel 20x5 apresenta uma seletividade em relação às proteínas do soro do leite, tendo em vista o aumento da concentração de proteínas da solução de soro de leite, em ambas as temperaturas e em todas as relações massa de gel/volume de solução utilizadas. Considerando-se, portanto, que há uma seletividade, com um conseqüente aumento da concentração, a maior concentração obtida com o aumento da relação massa de gel/volume de solução se justifica na medida em que, dado um certo grau de expansão mássica, uma maior massa de gel absorve uma maior quantidade de solução. Como há uma partição, ou seja, o gel é seletivo, significa que essa maior quantidade de solução absorvida, composta principalmente por espécies de baixa massa molecular, implica em uma maior concentração, em proteínas, da solução não absorvida.

Na Figura 4-15, como demonstração do balanço de massa, pode ser observada a variação de volumes da solução final obtida no processo de concentração com a utilização de diferentes massas de gel.

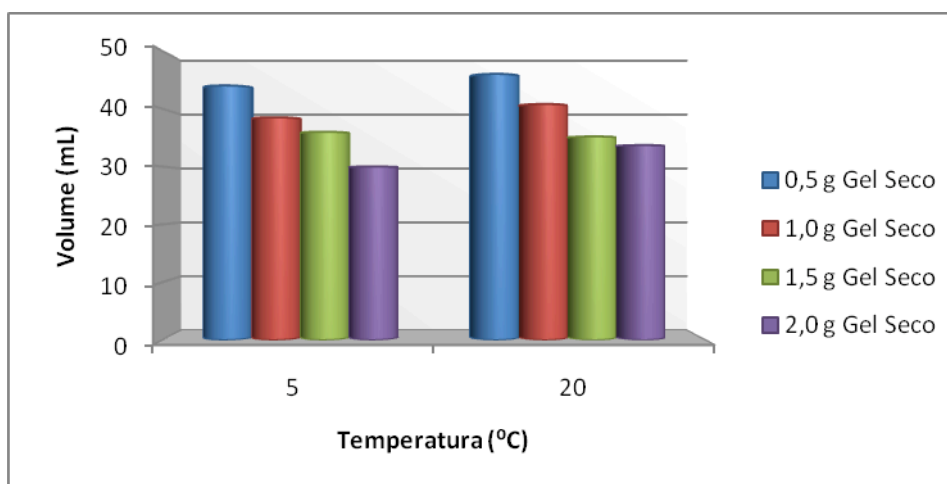


Figura 4-15 – Volumes finais das soluções de soro do leite obtidas no processo de concentração de proteínas com a utilização de massas diferentes de gel 20x5 e temperaturas de 5°C e 20°C

Assim, conforme esperado em termos do balanço de massa, em solução de soro do leite, quanto maior a massa adicionada de gel, menor o volume da solução concentrada obtida.

Para determinar a seletividade do processo de concentração via gel termossensível para cada amostra, ou seja, para medir o grau de exclusão de proteínas pelo gel em diferentes condições, foram calculadas as eficiências de separação, η , apresentadas na Tabela 4-7. O cálculo foi feito dividindo-se a diferença de concentração ΔC entre a solução inicial C_i e a solução concentrada C_f , pela diferença máxima de concentração, $\Delta C_{m\acute{a}x}$, obtida caso todas as moléculas de proteína presentes na

solução inicial fiquem na solução concentrada, conforme a equação 2.5 do item 2.5.3.

Tabela 4-7 - Análise da eficiência de separação no processo de concentração de proteínas com a variação da massa de gel 20x5

Massa Soro (g)	Temperatura (°C)	Massa Gel Seco (g)	V _{isol} (mL)	V _{fsol} (mL)	C _i (g/L)	C _f (g/L)	% Aumento de concentração	η (%)
0,5	5	0,5	50	44	1,712	1,890	10,394	76,219
0,5	5	1,0	50	38,5	1,712	1,911	11,615	38,884
0,5	5	1,5	50	36	1,712	2,140	24,957	64,176
0,5	5	2,0	50	30	1,712	2,166	26,488	39,733
0,5	20	0,5	50	46	1,712	1,834	7,108	81,746
0,5	20	1,0	50	40,8	1,712	1,899	10,915	48,404
0,5	20	1,5	50	35,2	1,712	2,127	24,214	57,589
0,5	20	2,0	50	33,7	1,712	2,280	33,182	68,603

Uma eficiência de 100% significa que o gel não absorve proteína, isto é, as proteínas do soro são completamente excluídas pelo gel. Ou seja, toda a expansão do gel é resultado da absorção de solvente e outras espécies de baixa massa molecular. Entretanto, se todas as espécies são absorvidas da mesma forma pelo gel, no caso o soluto (proteína) e o solvente (água, sais e lactose), a eficiência de separação é de 0%. Valores intermediários entre 0 e 100% indicam um certo grau de exclusão das proteínas.

Os valores de eficiência de separação obtidos variaram entre 39,733%, com a utilização de 2,0g de gel à 5°C, e 81,746% com a utilização de 0,5g de gel à 20°C, com uma média igual a 59,419%, conforme Tabela 4-7 e Figura 4-16.

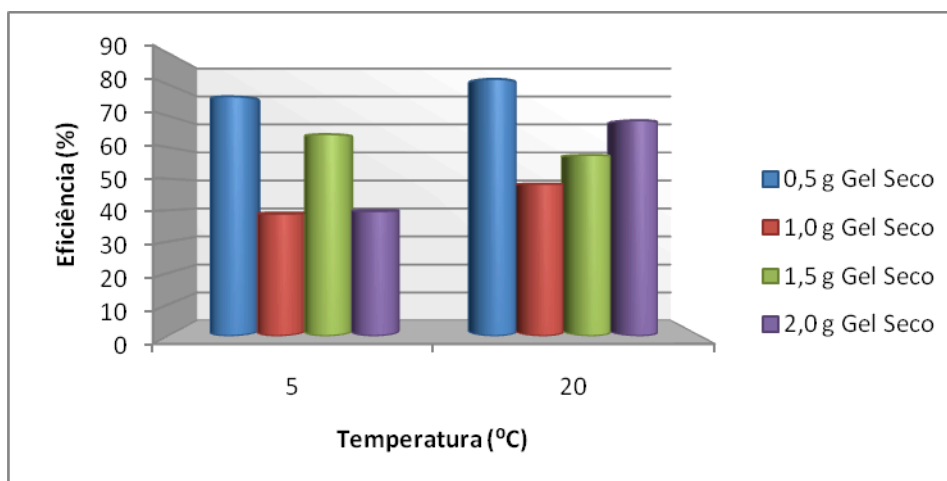


Figura 4-16 - Análise da eficiência de separação no processo de concentração de proteínas com a variação da massa de gel 20x5

Maiores valores de eficiência de separação, 76,219% à 5°C e 81,746% à 20°C, foram observados com a utilização de uma menor quantidade de gel, 0,5g.

A análise dos resultados obtidos no que tange à seletividade demonstra que o gel PNIPAAm 20x5 exclui seletivamente espécies de elevada massa molecular, no caso em estudo as proteínas do soro do leite, absorvendo preferencialmente as espécies de baixa massa molecular. Como esse processo pode ser conduzido em temperaturas baixas, abaixo da temperatura de transição de fases ($\cong 32^{\circ}\text{C}$), no presente estudo à 5°C e à 20°C, e não submete o sistema a qualquer tipo de “stress”, não representa qualquer risco de perda de atividade das proteínas, aspecto fundamental em qualquer processo de separação aplicado à área biológica.

A grande variação observada nos valores das eficiências de separação obtidos, para os sistemas estudados, está, possivelmente, associada ao entranhamento de proteínas na superfície do gel. Ou seja, proteínas que são efetivamente excluídas do gel, mas não são detectadas na solução concentrada, pois, apesar de não terem

sido absorvidas pelo gel, ficaram aderidas à sua superfície. Este comportamento vem ao encontro do observado por Miranda (MIRANDA, 1990) na utilização desse sistema para a concentração de calicreína urinária humana. As maiores eficiências observadas quando se utilizou massas menores de gel (0,5g), em ambas as temperaturas, corrobora a observação acima. Massa menor significa menos partículas de gel, portanto, menor área superficial para entranhamento.

O método usado para a dosagem de proteínas possibilitou somente a quantificação de proteínas totais. Dessa forma, foi possível observar que o gel 20x5 exclui proteínas, mas não é possível afirmar que esse gel seja capaz de excluir os quatro tipos de proteínas presentes em maior quantidade no soro do leite, quais sejam β -LG, α -LA, BSA e Imunoglobulinas. Assim, é possível que esse gel, além de concentrar proteínas, seja capaz de fracioná-las, isolando ou separando algumas delas em frações distintas. Sugere-se a realização de testes de identificação das proteínas nas soluções concentradas obtidas no presente trabalho. Além disso, se verificado que o gel 20x5 não é capaz de separar as proteínas em frações distintas, deve-se analisar a viabilidade de se sintetizar um gel mais fechado e seletivo especificamente para um ou alguns dos tipos de proteína do soro. A utilização de um gel que fosse capaz de realizar o fracionamento das proteínas seria muito interessante, devido às importantes propriedades funcionais e biológicas de cada proteína separadamente, propriedades essas que não são observadas nos concentrados protéicos, em virtude das interações entre as diversas proteínas.

4.4.2 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

Analisando-se as amostras que variaram apenas com a temperatura, notou-se que, de acordo com a Figura 4-17, em três dos quatro casos, uma maior concentração foi alcançada para a temperatura de 5 °C.

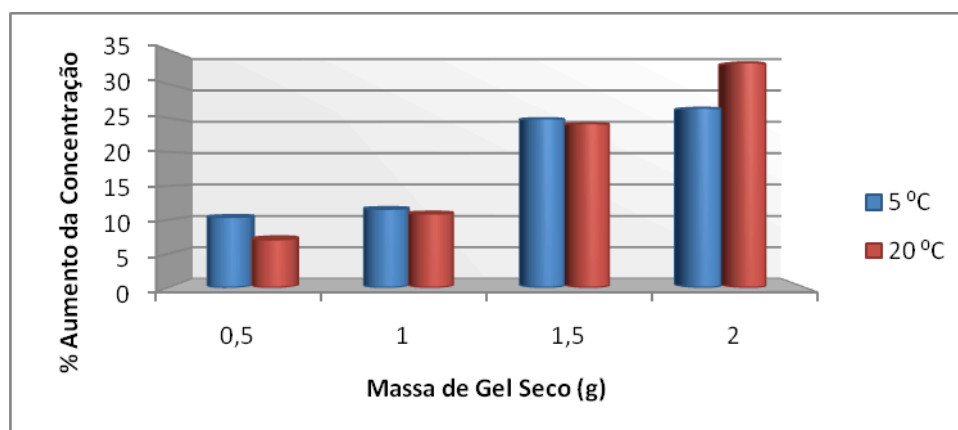


Figura 4-17 – Análise da influência da temperatura na concentração final de proteínas da solução após uso do gel 20x5

De acordo com a Figura 4-18, em três dos quatro casos, uma maior eficiência foi alcançada para a temperatura de 20 °C, não havendo diferença significativa nas eficiências médias em cada uma das temperaturas.

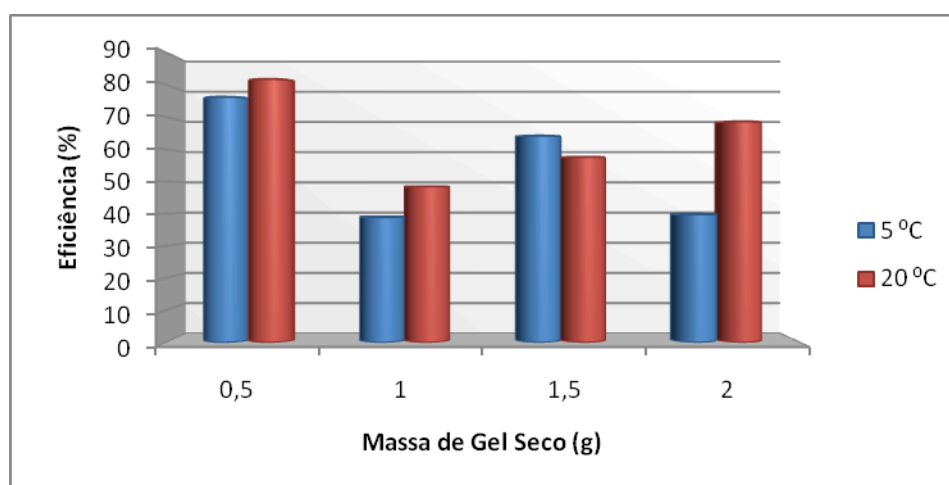


Figura 4-18 - Análise da eficiência de separação no processo de concentração de proteínas com a temperatura

Por sua vez, na Figura 4-19 são apresentados os valores de volumes finais das soluções, após entrarem em contato com o gel 20x5.

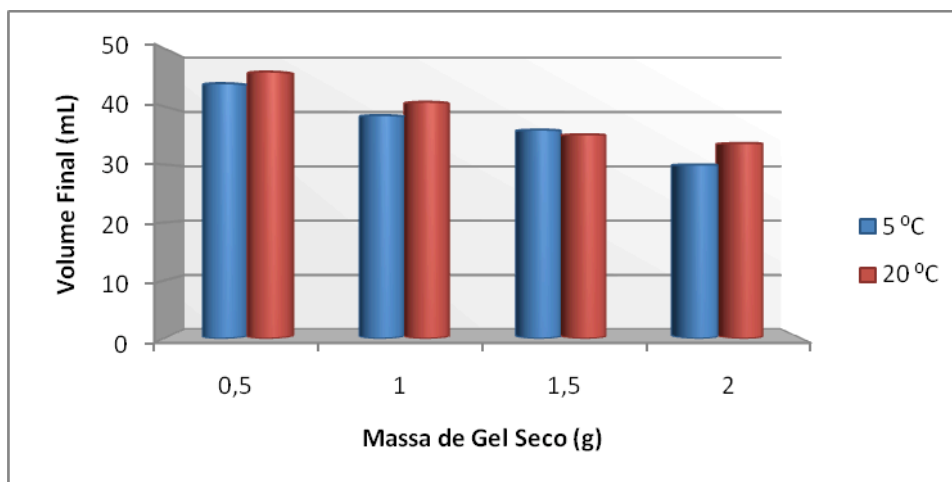


Figura 4-19 – Volumes finais das soluções de soro do leite obtidas no processo de concentração de proteínas com a utilização de massas diferentes de gel 20x5 e temperaturas de 5°C e 20°C

Assim, em consonância com os valores obtidos nos testes de expansão em água, em soro do leite o gel 20x5 se expande mais a 5°C do que a 20°C, pois, para todos os valores de massa de gel, os volumes medidos, após a concentração e retirada do gel, foram menores para a expansão a 5°C, ou seja, à 5°C o gel expandiu mais, resultando em uma solução concentrada com menor volume.

Os resultados obtidos para as diferentes temperaturas estudadas permitem registrar que não se observou qualquer mudança significativa na eficiência média de separação em função da temperatura. Tal resultado se justifica, considerando-se que a temperatura influencia, basicamente, no comportamento de fases do gel, ou seja, quanto maior a temperatura, menor o grau de expansão, conforme discutido no item 4.2.

Considerando-se a utilização em larga escala desse processo, tal resultado, a independência da seletividade com a temperatura e a forte dependência do grau de expansão com a temperatura, reveste-se de especial importância na medida em que aponta para a condução da etapa de concentração em temperaturas mais baixas, usualmente mais adequadas aos sistemas biológicos. Nessas temperaturas, como há uma maior expansão do gel sem mudança na seletividade, consegue-se uma maior concentração da solução de alimentação.

4.4.3 ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE SEPARAÇÃO COM A UTILIZAÇÃO DE GÉIS COM DIFERENTES PROPORÇÕES MONÔMERO/RETICULANTE

Os experimentos realizados com 2g de gel 10x1, tanto a 5°C, quanto a 20°C, resultaram em expansão do gel, absorvendo toda a solução de soro. Dessa forma, nenhuma solução concentrada em proteínas foi obtida, permitindo concluir que, nas condições testadas, diferentemente do gel 20x5, o gel 10x1 não foi seletivo para a exclusão de proteínas. Sugere-se a utilização posterior de menores quantidades de gel ou maior volume de solução de soro, para avaliar se é possível obter alguma seletividade e concentração com o gel 10x1.

4.4.4 SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO EM CICLOS DE SEPARAÇÃO

Ao se adicionar 1kg de gel 20x5 em 20L de soro, à 5°C, o gel se expande 10,671 vezes, de acordo com o grau de expansão mássico obtido nos testes de expansão

para esse gel. Nessas condições, ao se expandir, absorve 9,671 kg de água e solutos de baixa massa molecular, como lactose e sais. Considerando a eficiência de 100%, ou seja, que nenhuma molécula de proteína foi para dentro do gel nem para a superfície do mesmo, o volume obtido para a solução concentrada resultante do primeiro ciclo foi de 10,329L e a concentração de proteínas foi de 3,315g/L. Esta solução mais concentrada que a inicial foi então colocada em contato com 0,5kg de gel 20x5. Os valores de concentração e volume da nova solução obtida, bem como das soluções obtidas nos demais ciclos encontram-se no fluxograma da Figura 4-20.

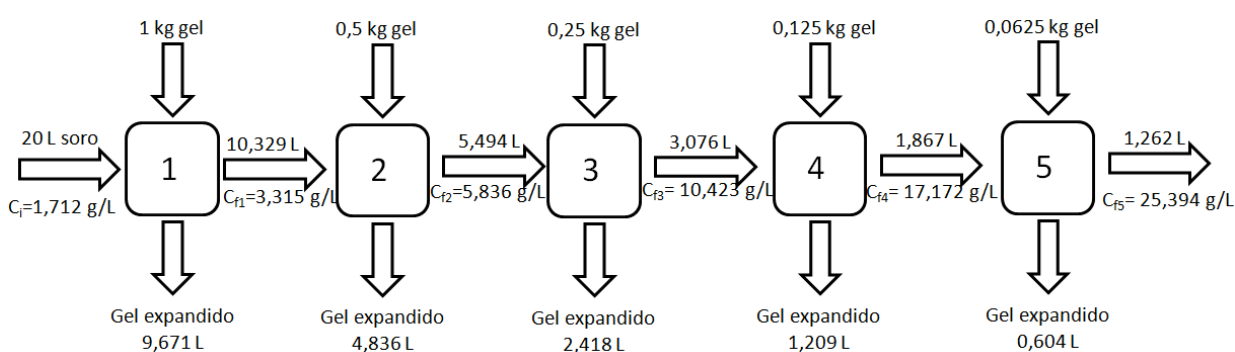


Figura 4-20 – Resultados obtidos a partir de simulação partindo-se de 20 litros de soro e 1kg de gel seco

Assim, após cinco ciclos, a solução concentrada obtida apresentou volume de 1,262L e concentração de proteínas de 25,394g/L.

Para comparação, realizou-se o mesmo procedimento com a utilização de metade da massa de gel 20x5, 0,5kg, à 5°C. O volume obtido após cinco ciclos de separação foi de 10,631L e a concentração de proteínas da solução final foi de 3,221g/L. Os volumes e concentrações finais para cada ciclo encontram-se no fluxograma da Figura 4-21.

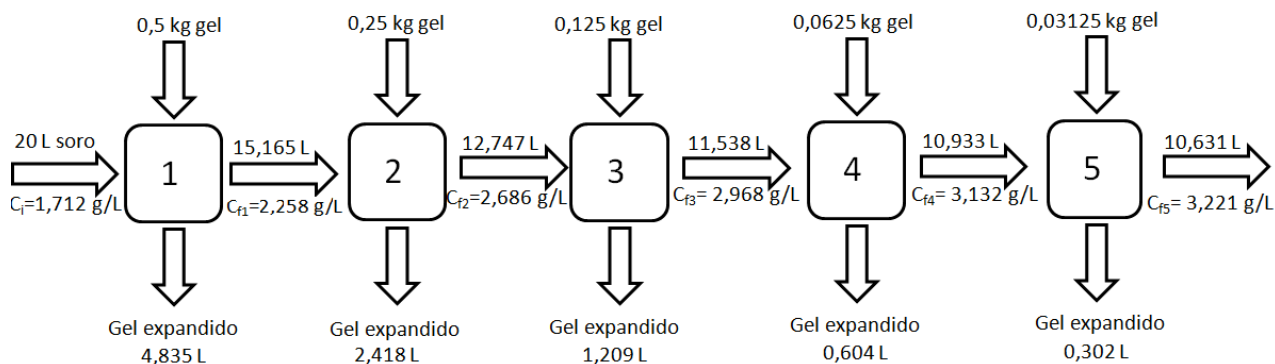


Figura 4-21 – Resultados obtidos a partir da simulação partindo-se de 20 litros de soro e 0,5 kg de gel seco

Dessa forma, pode-se concluir que a redução significativa do volume de soro em poucos ciclos, e o conseqüente aumento da concentração com menos ciclos, requer uma elevada relação massa de gel/volume de soro em cada ciclo. Assim, quanto maior a quantidade de gel em cada ciclo, mais rápido o processo de concentração. Entretanto, para aplicação em larga escala, deve-se avaliar a viabilidade econômica associada à utilização de maior massa de polímero e menos ciclos versus o custo operacional de um maior número de ciclos com menor quantidade de polímeros em cada etapa.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

Os géis estudados foram PNIPAAm, com diferentes porcentagens de monômero e de agente reticulante. Dessa forma, os géis sintetizados apresentaram diferentes capacidades de expansão e de separação.

Todos os géis apresentaram temperatura crítica inferior. Assim, em temperaturas mais baixas as interações polímero-solvente são muito favorecidas e os géis expandem mais. Esse grau de expansão vai diminuindo à medida que a temperatura aumenta. A certa temperatura, por volta de 32°C, o comportamento termodinâmico do gel se altera, de forma que as interações polímero-solvente não são mais favoráveis, os valores de grau de expansão são drasticamente reduzidos, o que resulta na contração do gel, expulsando a solução.

A contração de todos os géis sintetizados ocorreu entre 30 e 35°C, resultado compatível com os dados da literatura para a transição de fases. Além disso, os géis apresentaram um comportamento de expansão descontínuo, pois uma mudança infinitesimal da temperatura provocou uma enorme variação no volume dos géis.

Para todos os géis analisados, o maior valor de GEM foi obtido a uma temperatura de 5°C. O gel 10x1 apresentou os maiores valores de grau de expansão, e, portanto, maior capacidade de absorver solvente. Esse comportamento pode ser explicado pela baixa quantidade de monômeros totais e de reticulante utilizada em sua síntese, resultando numa estrutura com maior movimento das cadeias poliméricas,

maior abertura dos poros e, conseqüentemente, maior capacidade de absorver água.

À medida que a quantidade de monômeros totais e de reticulante empregada na síntese aumenta, as cadeias poliméricas se tornam mais firmes, os poros ficam menores e o grau de expansão mássico diminui. Desta forma, o gel 20x5, que apresenta maior quantidade de monômeros totais e de reticulante, possui o menor grau de expansão mássico.

A caracterização, via calorimetria exploratória diferencial e via termogravimetria, dos géis obtidos, mostrou a significativa influência do reticulante na temperatura de transição vítrea, comparativamente à concentração de monômeros totais. Este resultado sugere que, apesar de ambas as variáveis, monômeros totais e reticulante, contribuírem para o termo elástico, a densidade de ligações cruzadas tem um efeito mais significativo na rigidez dos géis. As elevadas temperaturas de degradação obtidas mostraram a estabilidade dos sistemas estudados.

Observou-se que quanto maior a relação massa de gel/volume de soro, maior a concentração em proteínas da solução final. Assim, maiores aumentos de concentração foram encontrados para a maior massa de gel 20x5, no caso 2g. A utilização de uma maior massa de gel é interessante do ponto de vista de processos industriais, uma vez que permite a obtenção de maior concentração final com um menor número de etapas de concentração. No entanto, deve-se analisar o impacto do uso de uma maior quantidade de polímeros no custo operacional da indústria.

Analisando-se as amostras que variaram apenas com a temperatura, concluiu-se que maiores concentrações das soluções finais são alcançadas para a temperatura de 5 °C.

Os resultados de seletividade foram expressos em termos do parâmetro de eficiência de separação (η), que é a medida do grau de exclusão do soluto, proteína, pelo gel. Os valores de eficiência de separação obtidos variaram entre 39,733%, com a utilização de 2,0g de gel à 5°C, e 81,746% com a utilização de 0,5g de gel à 20°C. Os maiores valores de eficiência de separação, 76,219% à 5°C e 81,746% à 20°C, foram obtidos com a utilização de uma menor quantidade de gel, 0,5g.

Dessa forma, pode-se concluir que o gel 20x5, ao se expandir, exclui as moléculas de proteína. Assim, esse gel é seletivo, à medida que absorve água e solutos de baixo peso molecular, enquanto exclui proteínas; podendo, portanto, ser utilizado para obtenção de concentrados protéicos de soro lácteo.

Além disso, o método usado para a dosagem de proteínas possibilitou somente a quantificação de proteínas totais. Dessa forma, foi possível observar que o gel 20x5 exclui proteínas, mas não é possível afirmar que esse gel foi capaz de excluir os quatro tipos de proteínas presentes em maior quantidade no soro do leite, quais sejam β -LG, α -LA, BSA e Imunoglobulinas. Assim, é possível que esse gel, além de concentrar proteínas, seja capaz de fracioná-las, isolando ou separando algumas delas em frações distintas.

Para comparação com o gel 20x5, utilizou-se o gel 10x1, por ser o mais aberto e de maior capacidade de absorção de solvente e solutos de baixa massa molecular. Diferentemente do gel 20x5, nas condições testadas, o gel 10x1 não foi seletivo para a exclusão de proteínas. Sugere-se a realização de testes posteriores com menores massas de gel 10x1, ou maiores volumes de soro; bem como a realização de testes de seletividade com os demais géis sintetizados, com o objetivo de verificar qual a menor quantidade de reticulante e monômero, ou qual a melhor estrutura polimérica, que pode ser empregada na síntese para obtenção de um gel que não absorve as proteínas do soro.

Por meio dos resultados obtidos no processo de concentração em ciclos de separação, concluiu-se que a redução significativa do volume de soro em poucos ciclos, e o conseqüente aumento da concentração com menor número de ciclos, requer uma elevada relação massa de gel/volume de soro em cada ciclo. Assim, quanto maior a quantidade de gel em cada ciclo, mais rápido o processo de separação. Entretanto, para aplicação em larga escala, deve-se avaliar a viabilidade econômica associada à utilização de maior massa de polímero e menos ciclos versus o custo operacional de um maior número de ciclos com menor quantidade de polímeros em cada etapa.

CAPÍTULO 6: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS:

Como formas de prosseguimento do estudo apresentado neste trabalho, são sugeridas as seguintes atividades:

- Separação das frações protéicas individuais presentes em maior concentração no soro do leite (β -LG, α -LA, BSA e Ig) por meio de fracionamento e purificação da solução protéica concentrada obtida com a utilização do gel 20x5.
- Realização de análises físico-químicas e microbiológicas nas amostras de concentrado e de permeado.
- Recuperação da lactose do permeado, visando gerar um produto com elevada concentração e pureza de lactose, para ser usada em indústrias biotecnológica, farmacêutica e de alimentos.
- Recuperação de sais e da água do permeado livre de proteínas e lactose, visando à redução da carga poluente do soro descartado pelos laticínios no ambiente.
- Estudo cinético para avaliar a expansão e conseqüente concentração de proteínas com o tempo, visando determinar qual o menor tempo necessário para atingir a expansão e concentração máxima.
- Modelagem e otimização do processo de concentração das proteínas do soro.
- Estudo da viabilidade econômica para construção de uma planta industrial.

CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, A. J. **Funcionalidades de proteínas do soro do leite bovino**, São Paulo: Ed. Manole, 2003.

BALDASSO, C. **Concentração e purificação das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BASSETTI, F.; PERES, L.; PETRUS, J. C.C.; QUADRI, M. B. **Aplicação de um modelo numérico na ultrafiltração de soro de queijo**. 4º Congresso ibero-americano em ciência e tecnologia de membranas. Florianópolis. CITEM 2003.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do Leite**. São Paulo: Nobel, 1986.

BOBRESHOVA, O.; NOVIKOVA, L.; KULINSTOV, P.; BALAVADZE, E. **Amino acids and water electrotransport through cation-exchange membranes**. Desalination, v. 6, n. 149, 2002.

BILLMEYER, F. W. **Textbook of Polymer Science**, Wiley, 3a ed., New York, 1994.

BOSCHI, J. R. **Concentração e Purificação das Proteínas do Soro do Queijo por Ultrafiltração**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Porto Alegre - Porto Alegre, RS, Brasil, 2006.

BRAMAUD, C.; AIRNAR, P.; DAUFIN, G. **Optimisation of a whey protein fractionation process based on the selective precipitation of α -lactalbumin**. Le Lait, v. 77, n.3, 1997

BRANDÃO, S.C.C. **Soro: um desafio para as fábricas de queijo**. Leite & Derivados, n.15, 1994.

BRANS, G.; SCHROEN, C.G.P.H.; VAN DER SMAN, R.G.M.; BOOM, R.M. **Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges**. Journal of Membrane Science, v.243, 2004.

BROMBERG, L. E.; RON, E. S. **Temperature-Responsive Gels and Thermogelling Polymer Matrices for Protein and Peptide Delivery**. Advanced Drug Delivery Reviews, 31, 1998.

BROWNE, W.J.; NORTH, A.C.T.; PHILLIPS, D.C. **A possible three-dimensional structure of bovine α -lactalbumin based on that of hen's egg-white lysozyme**. J. Mol. Biol., 42, 1969.

BROWNLOW, S.; MORAES CABRAL, J.H.; COUPER, R.; FLOWER, D.R.; YEWDALL, S.J.; POLIKARPOV, I.; NORTH, A.C.T.; SAWYER, L. **Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still an enigmatic lipocalin**. Structure, 5, 1997.

BUNNER, J.R. **Milk proteins**. In: WHITAKER, J.R.; TANNENBAUM, S.R. (Eds.). Food proteins. AVI Publishers Company, Inc., 1977.

BYLUND, G. **Dairy Processing Handbook**. Tetra Pak Processing Systems, 1995.

CARDI, L. et al. **Intumescimento filamentoso no processo de lodos ativado aplicados ao tratamento de soro de queijo: caracterização e uso de floculantes para melhorar a sedimentabilidade**. Engenharia ambiental. V.4, n.2, p. 26-37. 2007

CHEANG, B.; ZYDNEY, A.L. **A two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate**. Journal of Membrane Science, v. 231, 2004.

CORREA, A. M. **Géis Seletivos para Concentração de Interferon**. Relatório de Iniciação Científica, UFMG. 2009.

CUSSLER, E. L.; WANG, K. L.; BURBAN, J. H. **Hydrogels as Separation Agents**. Advances in Polymer Science. Responsive Gels: Volume Transitions II. Editora Springer-Verlag, 1993.

DAI-DONG, J.X.; NOVAK, G.; HARDY, J. **Stabilization of vitamin C by β -lactoglobulin during heat treatment.** Science des Aliments, 10:393, 1990.

DÍEZ-PEÑA, E.; QUIJADA-GARRIDO, I.; BARRALES-RIENDA, J.M. **On the water swelling behaviour of poly(N-isopropylacrylamide) [P(N-iPAAm)], poly(methacrylic acid) [P(MAA)], their random copolymers and sequential interpenetrating polymer networks (IPNs).** Polymer, 43, 2002.

DUSEK, K. **Advances in Polymer Science.** Responsive Gels: Volume Transitions I. Editora Springer-Verlag, 1993.

EBNER, K.E.; MCKENZIE, L.M. **α -lactalbumin and galactosyl transferase in rat serum and their relationship to milk secretion.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 49:1.624-1.630, 1972.

EECKMAN, F.; MOËS, A. J.; AMIGHI, K. **Poly(N-isopropylacrylamide) copolymers for constant temperature controlled drug delivery.** International Journal of Pharmaceutics, 273, 2004.

ELEGE Alimentos, **Especificação Técnica do Produto.** Porto Alegre, 2005.

FOX, P.F. & McSWEENEY, P.L.H. **Dairy Chemistry and Biochemistry,** First Edition, London: Thomson Science, 1998.

FREITAS, R. F. S. **Extractions with and Phase Behaviour of Temperature-Sensitive Gels.** Tese de Doutorado, University of Minnesota, USA ,1986.

FREITAS, R. F. S.; CUSSLER, E. L. **Temperature sensitive gels as extraction solvents.** Chemical Engineering Science, 42, 1987a.

FREITAS, R. F. S.; CUSSLER, E. L. **Temperature sensitive gels as size selective absorbants.** Separation Science and Technology, 22 (2 & 3), 911, 1987b.

GEHRKE, S. H. **Synthesis, Equilibrium Swelling, Kinetics Permeability and Applications of Environmentally Responsive Gels**. Advances in Polymer Science. Responsive Gels: Volume Transitions II. Editora Springer-Verlag, 1993.

GOMBOTZ, W.R.; HOFFMAN, A.S. **Hydrogels in Medicine & Pharmacy**, Vol.1, N.A. Peppas, (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 1986.

GRULKE, E. A. **Polymer Process Engineering**, PTR PH, New Jersey, 1994.

HARAGUCHI, F. K., **Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana**. Revista de Nutrição. Campinas. 2005.

HIEMENZ, P. C. **Polymer Chemistry: The basic concepts**, Marcel Dekker, New York, 1984.

HJERTEN, S., **Molecular sieve chromatography on polyacrylamide gels, prepared according to a simplified method**. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1962.

HUFFMAN, L. M. **Processing whey protein for use as a food ingredient**. Food Technology, Feb, 1996.

IAMETTI, S.; DE GREGORI, B.; VECCHIO, G.; BONOMI, F. **Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β -lactoglobulin**. Eur. J. Biochem., 237, 1996.

IRIE, M. **Stimuli-Responsive Poly(N-isopropylacrylamide), Photo- and Chemical-Induced Phase Transitions**. Advances in Polymer Science. Responsive Gels: Volume Transitions II. Editora Springer-Verlag, 1993.

JAMES, B. J. JING, Y; CHEN, X. D. **Membrana fouling during filtration of milk – a microstructural study**. Journal of food chemical engineering, v. 60, pp. 431-437. 2003.

JANG, H.; SWAISGOOD, H. **Analysis of ligand binding and β -lactoglobulin denaturation by chromatography on immobilized trans-retinal**. J. Dairy Sci., 73, 1990.

KLOUDA, L.; MIKOS, A. G. **Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutis, 68, 2008.

KOST, J.; LANGER, R. **Responsive Polymeric Delivery Systems**. Advanced Drug Delivery Reviews, 46, 2001.

LAGRANGE, V.; DALLAS, P. **Produtos de soro dos EUA: Disponibilidade, recursos tecnológicos, aplicações**. Engenharia de Alimentos, n.15, 1997.

LANGE, D. C.; KOTHARI, R.; PATEL, R.; PATEL, S. C. **Retinol and retinoic acid bind to a surface cleft in bovine β -lactoglobulin: a method of binding site determination using fluorescence resonance energy transfer**. Biophysical Chem., 74, 1998.

LANGER, R.; PEPPAS, N. A. **Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology**. AICHE Journal, 49, 2003.

LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal, São Paulo: Edição Funep, Cap. 5, 2000.

LUCENA, M. E.; ALVAREZ, S.; MENENDEZ, C.; RIERA, F.A.; ALVAREZ, R. **α -Lactalbumin precipitation from commercial whey protein concentrates**. Separation and Purification Technology, v. 52, 2007.

LUQUET, F.M. **Leche y productos lácteos: vaca - oveja - cabra**. La leche: de la mama a la lechería. 2. ed. Zaragoza, Acribia, 1993.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a Polímeros**. 2ª Ed. Rev. e ampl. São Paulo: Edgard Blucher, 2004.

MCINTOSH, G.H.; ROYLE, P.J.; LELEU, R.K.; REGISTER, G.O.; JOHNSON, M.A.; GRINSTED, R.L.; KENWARD, R.S.; SMITHERS, G.W. **Whey protein as functional ingredients**. Int. Dairy J., n. 8, 1998.

MILLER, G.D.; JARVIS, J.K.; McBEAN, L.D. Handbook of Dairy Products and Nutrition. 2nd Ed. CRC Press LCC, Illinois, 2000.

MIRANDA, T. L. S. **Utilização do Gel Termossensível Poli(N-isopropilacrilamida) na Concentração de Urina Humana Visando a Obtenção de Caliceína Humana, em Larga Escala**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, Brasil, 1990.

MORR, C. V.; FOEGEDING, E. A. **Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report**. Food Technology, 44, 1990.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**. Center for membrane science and technology, University of Twente, Enschede, The Netherlands, 2000.

NAGOKA, S.; FUTAMURA, Y.; MIWA, K.; AWANO, T.; YAMAUCHI, K.; KANAMARU, T. **Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin**. Bioph. Biochem. Res. Comm., 281:11-17, 2001.

NEVES, B.S. **Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios**. In. **Embrapa - Gado de Leite**. Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar, 2001.

OLIVEIRA, E. D. **Estudo das propriedades e do comportamento de fase de géis termossensíveis**. 1992. Dissertação de mestrado em Química, Físico – Química -

Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.

OLIVEIRA, E. H. P.; PETRUS, J. C. C. **Influência da concentração de pvdf em membranas de ultrafiltração para tratamento de efluentes da indústria frigorífica**. 4º Congresso ibero-americano em ciência e tecnologia de membranas. Florianópolis. CITEM, 2003.

OOYA, T.; AKUTSU, M.; KUMASHIRO, Y.; YUI, N. **Temperature-Controlled Erosion of Poly(N-isopropylacrylamide)-based Hydrogels Crosslinked by Methacrylate-introduced Hydrolyzable Polyrotaxane**. Science and Technology of Advanced Materials, 6, 2005.

OUTINEN, M.; TOSSAVAINEN, O.; TUPASELA, T.; KOSELA, P.; KOSKINEN, H.; RANTAMAKI, P.; SYVAOJA, E.L.; ANTILA, P.; KANKARE, V. **Fractionation of Proteins from Whey with different pilot scale processes**. Lebensm. Wiss. Technol. V.29, 1996.

PALAZOLO, G.; RODRIGUEZ, F.; FARRUGIA, B.; PICO, G.; DELORENZI, N. **Heat treatment of β -lactoglobulin: structural changes studies by partitioning and fluorescence**. J. Agr. Food Chem., 48:3.817-3.822, 2000.

PANICK, G.; MALESSA, R.; WINTER, R. **Differences between the pressure and temperature-induced denaturation and aggregation of β -lactoglobulin A, B, and AB monitored by FT-IR spectroscopy and small angle X-ray scattering**. Biochemistry, 38, 1999.

PEREIRA, D. B. C. **Implementação de métodos para estimativa de desnaturação de soro-proteínas em controle de qualidade de produtos lácteos**. Milkbizz Temático Tecnologia, fascículo I, ano I, n. 1, São Paulo, 2002.

PHOTCHANACHAI, S.; KITABATAKE, N. **Heating of β -lactoglobulin. A solution in a closed system at high temperatures**. J. Food Science, 66, 2001.

PORTO, L.M.; SANTOS, R.C.; MIRANDA, T.L.S. **Determinação das melhores condições operacionais no processo de produção de ricota**. Boletim CEPPA, v. 23, n.1, 2005.

QIU, Y.; PARK, K. **Environment-Sensitive Hydrogels for Drug Delivery**, Advanced Drug Delivery Reviews, 53, 2001.

RODRIGUEZ, F. **Chemical Engineering Series: Principles of Polymer System**, 2ª Edição. Editora McGraw-Hill, 1982.

SALZANO, J. **Nutritional supplements: practical applications in sports, human performance and life extension**. Symposium series 007; São Paulo; 2002.

SERPA, L. **Concentração de Proteínas em Rejeitos de Queijarias**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Erechim, RS, 2005.

SERPA, L.; PRIAMO, W. L.; REGINATTO, V. **Destino Ambientalmente Correto a Rejeitos de Queijaria e Análise de Viabilidade Econômica – 2nd International Workshop – Advances in Cleaner Production**, São Paulo, 2009.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996.

SGARBIERI, V. C. **Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-químicas das Proteínas do Leite**. Brazilian Journal of Food Technology. V. 8, n. 1, 2005.

SHIBAYAMA, M.; TANAKA, T. **Phase Transition and Related Phenomena of Polymer Gels**. Advances in Polymer Science. Responsive Gels: Volume Transitions I. Editora Springer-Verlag, 1993.

SILVA FILHO, J. F. **Estudo dos Parâmetros de Síntese do Gel Termossensível Poli(N-isopropilacrilamida)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte, MG, Brasil, 2005.

SILVA, A. T.; VAN DENDER, A. G. F.; **Importance of reduced fat dairy products and strategies for developing and optimizing sensory quality**, Dairy Journal Bimonthly, Cândido Tostes Dairy Institute, v. 60, 2005.

SILVA, F. P. **Síntese e caracterização de hidrogéis de poli(N-isopropilacrilamida)-co-(Ácido Metacrílico) e sua aplicação como sistemas de liberação controlada de medicamentos**. Dissertação de mestrado em Engenharia Química – Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

SKOOG, D.A, HOLLER F.J.; NIEMAN T.A, **Princípios de Análise Instrumental**, 5ª Edição, Editora McGraw-Hill/Interamericana de España S. A. U. , Madrid, 2001.

SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M. **Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química**. LTC; Rio de Janeiro, Quinta Edição, 1997.

SOUSA, E. M. B.; SOUSA, A.; SOUSA, T. G. F. de; VIANA, V.; BOTELHO, L. **SBA15-Collagen Hybrid Material for Drug Delivery Applications**. Journal of Non-Crystalline Solids, in press, 2006.

SOUSA, R. G. **Caracterização Estrutural do Gel Termossensível Poli(N-isopropilacrilamida) e seus Copolímeros com a Acrilamida**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte, MG, Brasil, 1997.

SOUSA, R. G. **Caracterização Termodinâmica de Géis Termossensíveis no Contexto de Ponto Crítico e Transição de Fase**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte, MG, Brasil, 1993.

STUART, D.I.; ACHARYA, K.R.; WALKER, N.P.C.; SMITH, S.G.; LEWIS, M.; PHILLIPS, D.C. **α -lactalbumin possesses a novel calcium binding loop**. Nature, 1986.

TAULIER, N.; CHALIKIAN, T. **Characterization of pH-induced transitions of β -LG: ultrasonic, densitometric, and spectroscopy studies**. J. Mol. Biol., 14, 2001.

VANAMAN, T.C.; BREW, K.; HILL, R.L. **The disulfide bonds of bovine α -lactalbumin**. J. Biol. Chem., 245, 1970.

TECALIM. **Usina de Processamento de Leite e Derivados - Recebimento, Controle e Processamento**, 2009. Disponível em <<http://tecalim.vilabol.uol.com.br/usinaleite.pdf>>. Acesso em: 28 out., 2010.

VEISSEYRE, R. **Lactología técnica: composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche**. 2a ed. Zaragoza: Acribia, 1988.

WANG, K. L.; BURBAN, J. H.; CUSSLER, E. L., **Hydrogels as separation agents**. Advances in Polymer Science, Responsive Gels: Volume Transitions II, Springer-Verlag, Berlim, 1993.

WASZCZYNSKYJ, N.; MACIEL, A. C. D. **Obtenção de Lactose do Soro de Queijo Tipo Mussarela**, Curitiba, v. 16, n.2, 1998.

YADA, R. Y. **Protein in Food Processing**. England: Woodhear Publishing, 2004.

YANG, J.; DUNKER, A.K.; POWERS, J.R.; CLARK, S.; SWANSON, B.G. **Beta-lactoglobulin molten globule induced by high pressure**. J. Agr. Food Chem., 49, 2001.

YI, J. Z.; MA, Y. Q.; ZHANG, L. M. **Synthesis and decoloring properties of sodium humate/poly N-(isopropylacrylamide) hydrogels**. Bioresource Technology, volume 99, issue 13, September 2008.

ZADOW, J.G. **Whey and Lactose Processing**. England: Elsevier Applied Science, 1992.

ZINSLY, P. F.; SGARBIERI, V. C.; DIAS, N. F. G. P.; JACOBUCCI, H. B.; PACHECO, M. T. B.; BALDINI, V. L. S. **Produção piloto de concentrados de**

proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. Braz. J. Food Technol. Campinas, 4, 2001.

ZYDNEY, A. L. **Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation.** International Dairy Journal, v. 8, 1998.

ANEXO I: DADOS RELACIONADOS AO PROCEDIMENTO E À OBTENÇÃO DO GRAU DE EXPANSÃO MÁSSICO.

Tabela AI-1 - Massa dos géis secos e expandidos a diferentes temperaturas

Géis	Massa gel seco (g)	Massa de gel expandido (g)								
		5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	45°C	55°C
12x1	0,508	19,784	17,526	14,824	13,266	10,901	7,871	1,712	1,098	0,990
13x1	0,504	13,208	12,277	11,111	9,841	8,488	6,544	2,234	1,518	1,372
14x1	0,502	16,175	14,184	12,449	11,107	9,525	7,063	1,512	1,148	1,111
15x1	0,507	12,926	11,514	10,266	8,769	7,542	6,077	1,251	0,956	0,921
20x1	0,504	12,424	7,356	9,135	8,089	6,938	5,300	1,241	1,098	0,913
10x1	0,500	22,008	19,964	18,798	15,781	13,927	9,365	1,544	1,19	0,972
10x2	0,502	12,493	11,521	11,011	9,525	7,934	5,843	1,133	1,033	0,892
10x4	0,501	6,961	6,329	5,596	5,180	4,482	3,316	1,422	1,051	1,026
10x5	0,505	7,239	6,091	5,562	5,157	4,242	3,382	1,513	1,211	1,058
10x6	0,505	5,517	4,692	4,429	3,830	3,320	2,581	1,354	1,109	1,026
20x5	0,500	5,336	4,526	3,551	2,514	1,865	1,506	0,96	0,825	0,769

ANEXO II: GRÁFICOS DE EXPANSÃO MÁSSICA DE GÉIS PNIPAAEM EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

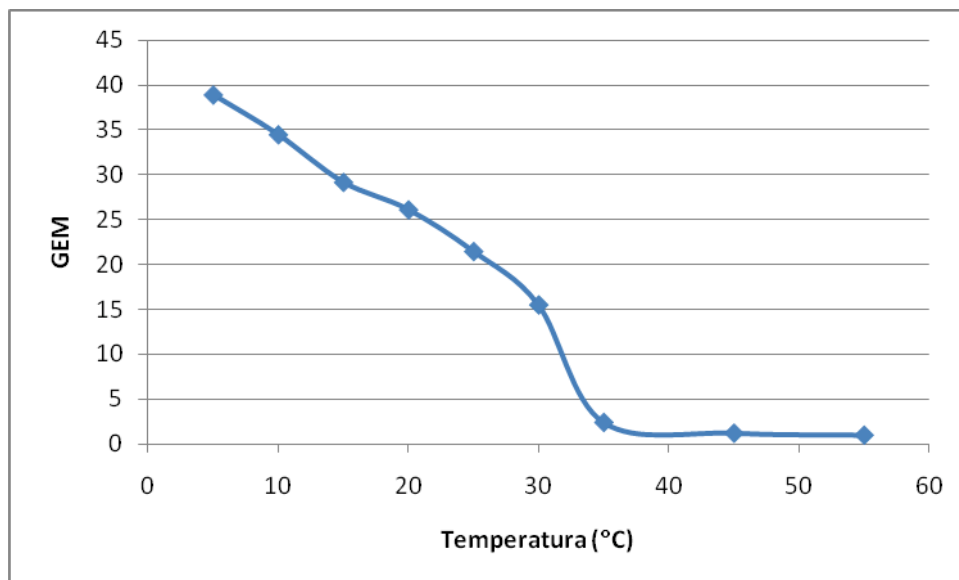


Figura All-1 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 12x1 em função da temperatura

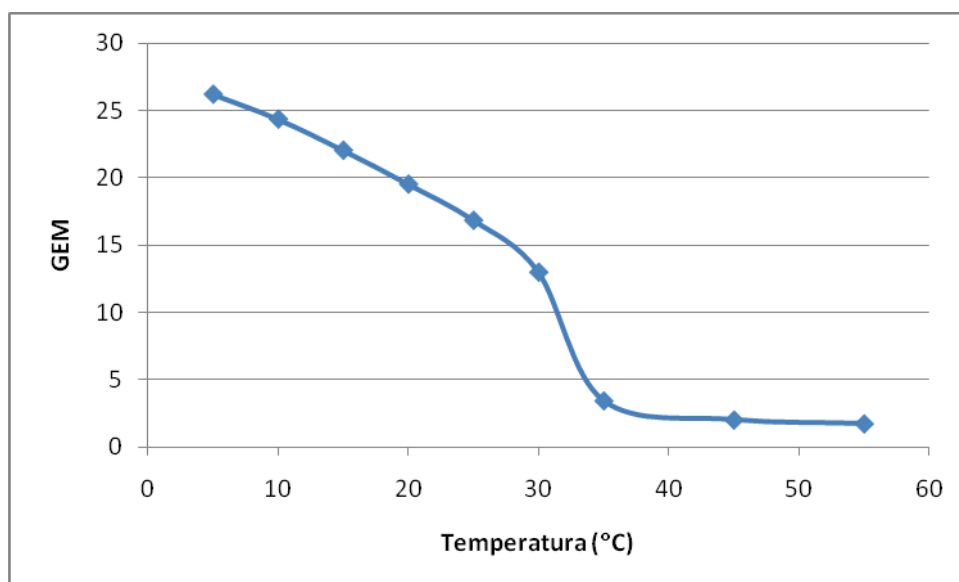


Figura All-2 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 13x1 em função da temperatura

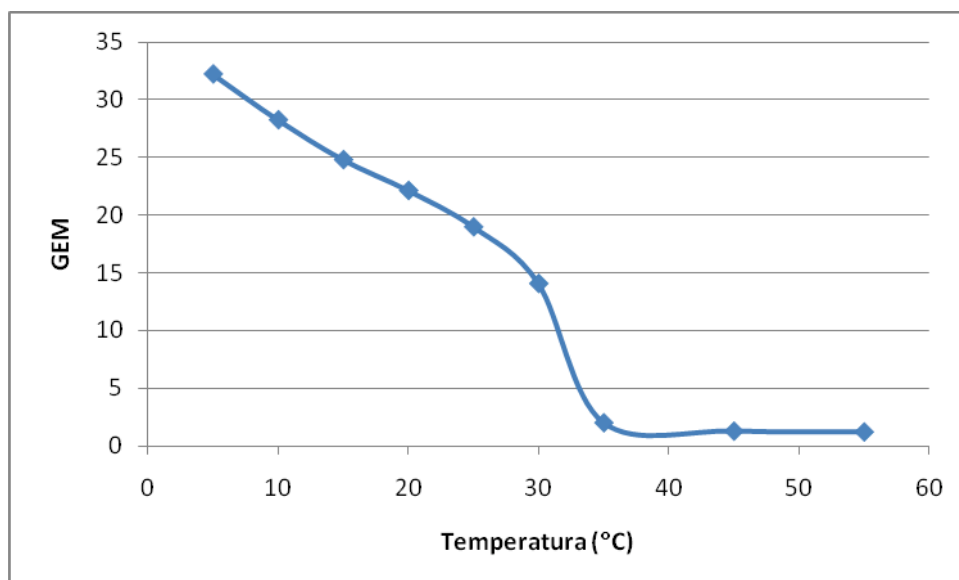


Figura AII-3 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 14x1 em função da temperatura

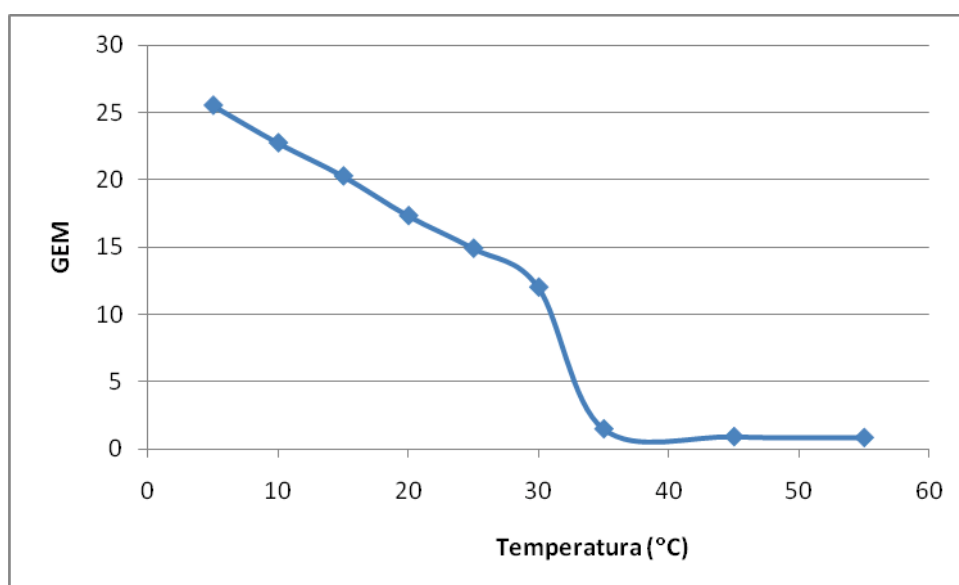


Figura AII-4 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 15x1 em função da temperatura

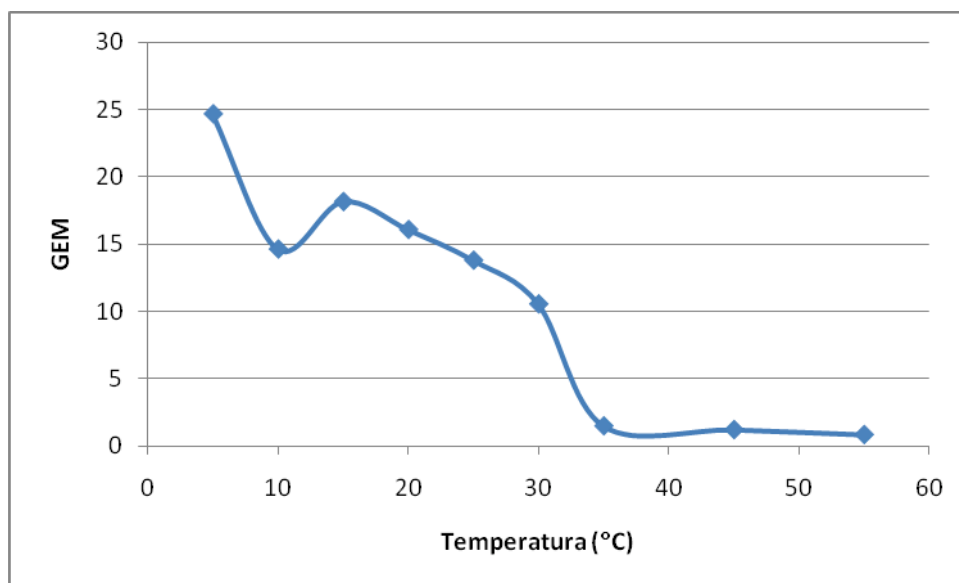


Figura AII-5 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 20x1 em função da temperatura

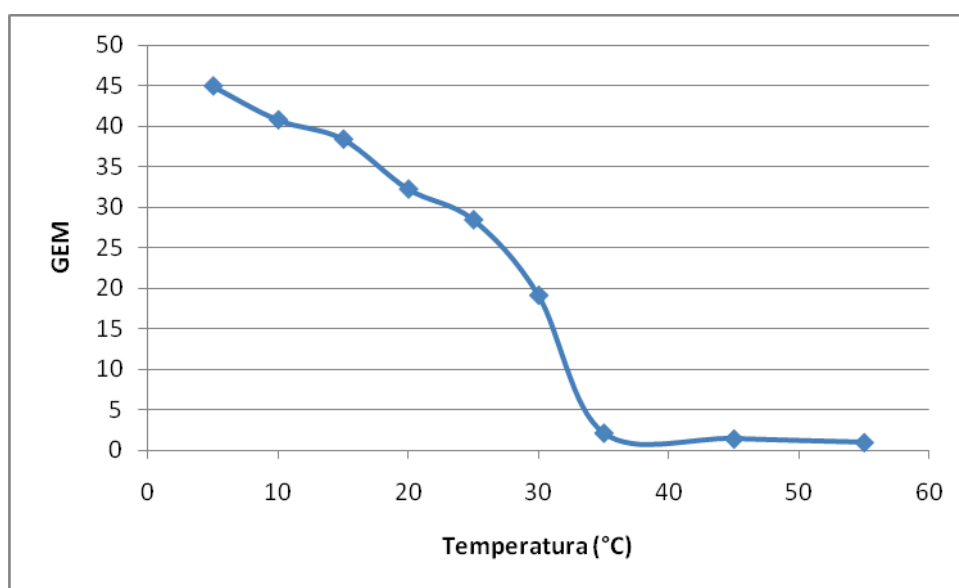


Figura AII-6 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 10x1 em função da temperatura

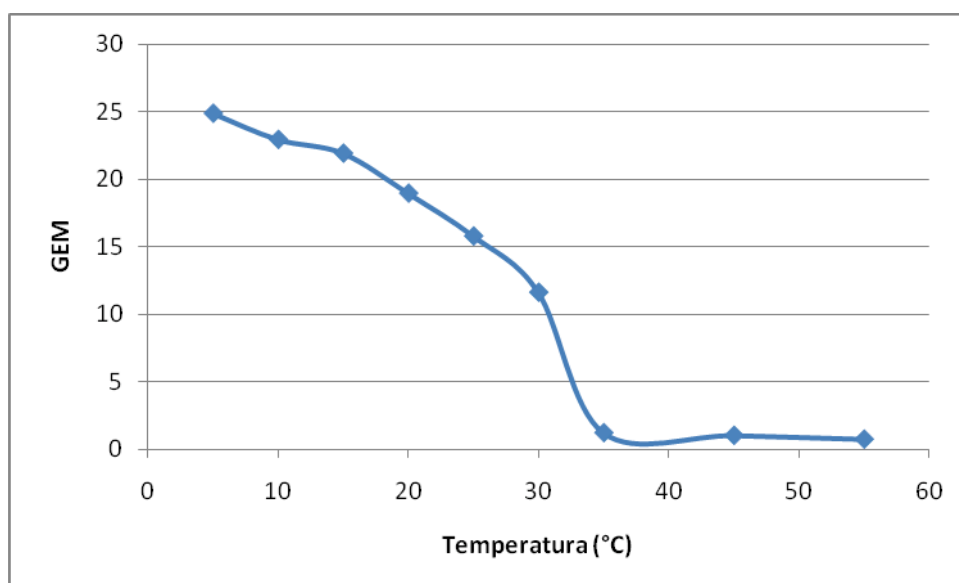


Figura All-7 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 10x2 em função da temperatura

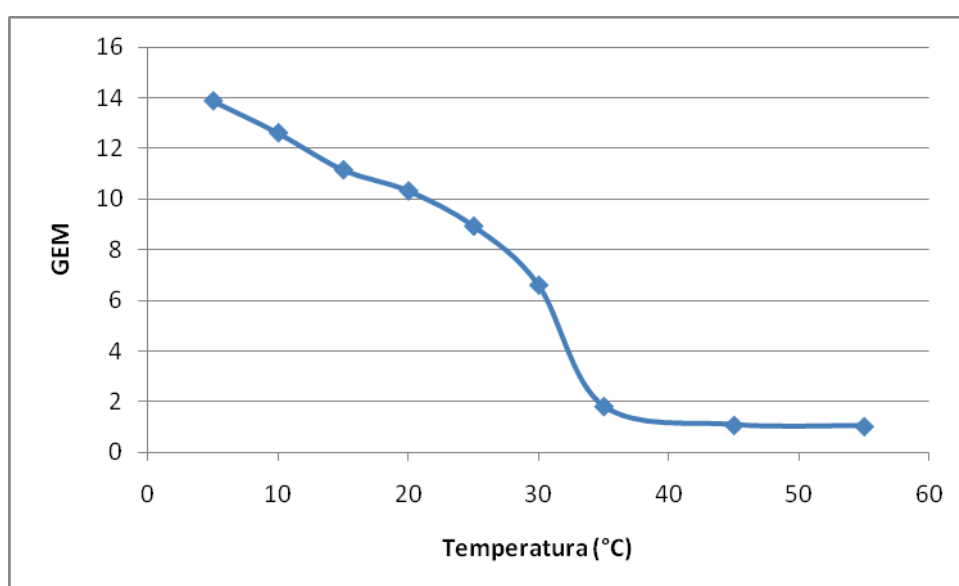


Figura All-8 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 10x4 em função da temperatura

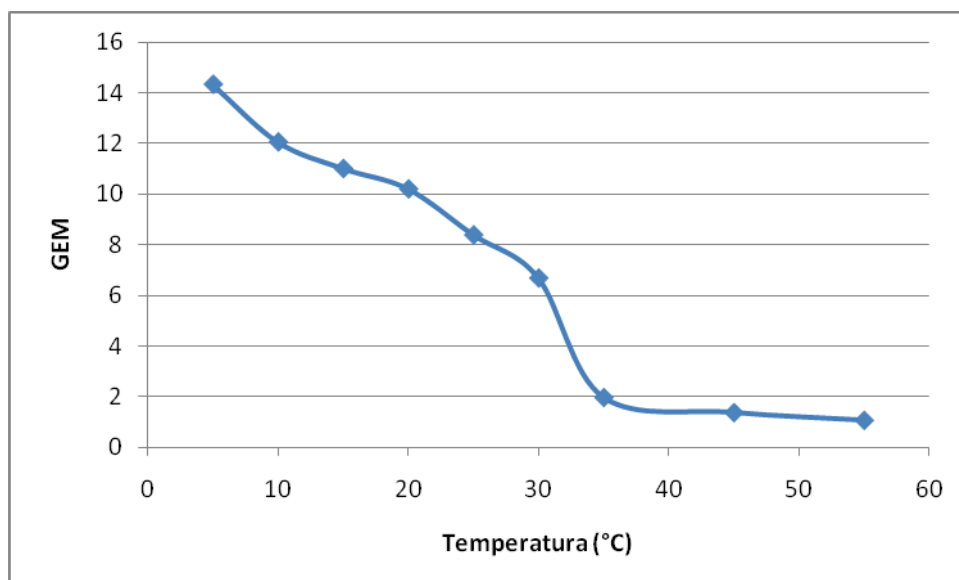


Figura AII-9 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 10x5 em função da temperatura

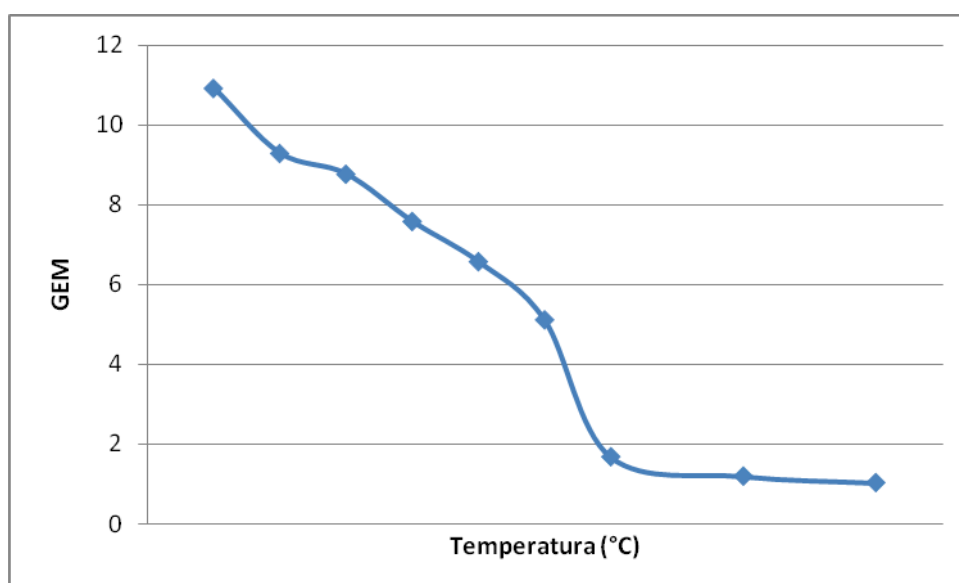


Figura AII-10 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 10x6 em função da temperatura

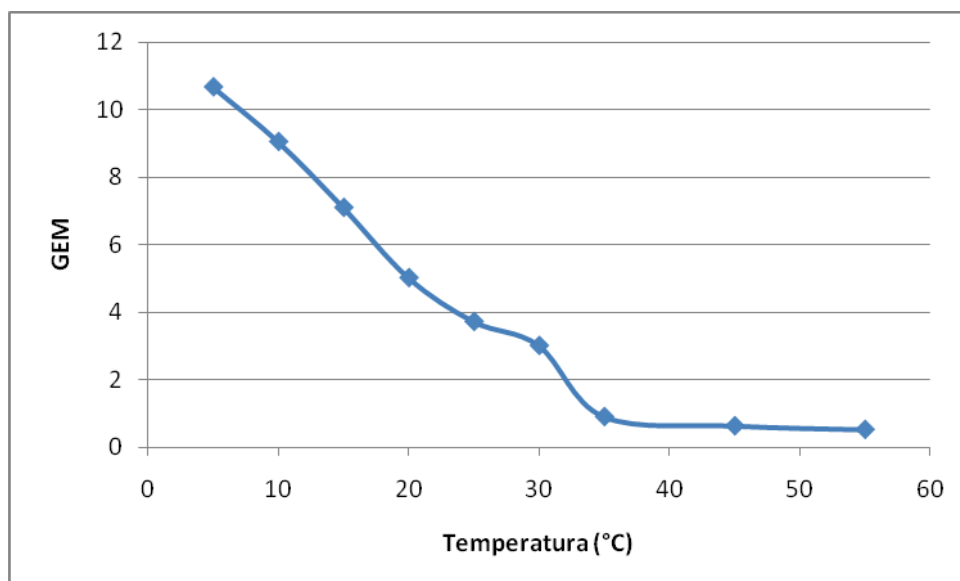


Figura AII-11 – Gráfico de expansão mássica do Gel N-isopropilacrilamida 20x5 em função da temperatura

ANEXO III - DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO LOWRY MODIFICADO

Tabela AIII-1 - Dados para a construção da Curva Analítica para o Padrão de Proteínas

Concentração de Proteína (ug/ml)	Absorbância (562nm)			Média
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	
0	0,147	0,126	0,131	0,135
1	0,163	0,155	0,161	0,160
10	0,381	0,564	0,445	0,463
25	1,034	1,009	1,006	1,017
50	1,676	1,695	1,686	1,686
100	2,715	2,826	2,795	2,779

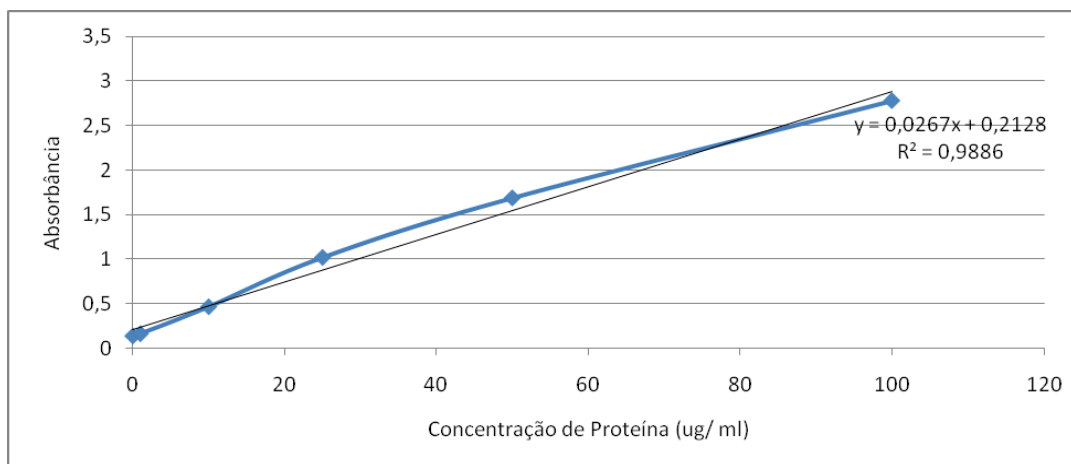


Figura AIII-1 – Curva Analítica para o Padrão de Proteínas

Tabela AIII-2 - Determinação da absorbância de proteínas das amostras de A a H

Amostras	Absorbância (562nm)			Absorbância Média
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	
A	1,443	1,485	1,495	1,474
B	1,446	1,525	1,494	1,488
C	1,582	1,720	1,621	1,641
D	1,625	1,655	1,695	1,658
E	1,395	1,490	1,425	1,437
F	1,458	1,522	1,461	1,480
G	1,604	1,649	1,645	1,633
H	1,675	1,775	1,755	1,735

Tabela AIII-3 - Determinação da concentração de proteínas nas amostras de A a H a partir dos valores de absorbância

Amostras	Concentração (g/L)			Concentração Média (g/L)
	Valor 1	Valor 2	Valor 3	
A	1,843	1,906	1,921	1,890
B	1,847	1,966	1,919	1,911
C	2,051	2,258	2,110	2,140
D	2,116	2,161	2,221	2,166
E	1,771	1,913	1,816	1,834
F	1,865	1,961	1,869	1,899
G	2,084	2,152	2,146	2,127
H	2,191	2,340	2,310	2,280

ANEXO IV - RESULTADOS PARA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS, AUMENTOS DE CONCENTRAÇÃO E EFICIÊNCIAS DE SEPARAÇÃO

Tabela AIV-1 – Resultados para Concentração de Proteínas

C_i (g/L)	C_{f1} (g/L)	C_{f2} (g/L)	C_{f3} (g/L)	C_f MÉDIA (g/L)
1,712	1,843	1,906	1,921	1,890
1,712	1,847	1,966	1,919	1,911
1,712	2,051	2,258	2,110	2,140
1,712	2,116	2,161	2,221	2,166
1,712	1,771	1,913	1,816	1,834
1,712	1,865	1,961	1,869	1,899
1,712	2,084	2,152	2,146	2,127
1,712	2,191	2,340	2,310	2,280

Tabela AIV-2 – Resultados para Aumento de Concentração de Proteínas

% Aumento de concentração 1	% Aumento de concentração 2	% Aumento de concentração 3	% Aumento de concentração Média	Desvio Padrão (%)
7,652	11,327	12,202	10,394	± 2,415
7,914	14,827	12,115	11,619	± 3,483
19,815	31,891	23,228	24,978	± 6,225
23,578	26,203	29,704	26,495	± 3,073
3,451	11,764	6,077	7,097	± 4,250
8,964	14,565	9,183	10,904	± 3,172
21,740	25,678	25,328	24,249	± 2,180
27,953	36,704	34,954	33,204	± 4,630

Tabela AIV-3 – Resultados para Eficiência de Separação

V_i (mL)	V_f (mL)	Eficiência 1 (%)	Eficiência 2 (%)	Eficiência 3 (%)	Eficiência média (%)	Desvio Padrão (%)
50,0	44,0	56,112	83,064	89,482	76,219	± 17,707
50,0	38,5	26,495	49,639	40,557	38,897	± 11,661
50,0	36,0	50,953	82,006	59,729	64,229	± 16,008
50,0	30,0	35,367	39,305	44,555	39,742	± 4,610
50,0	46,0	39,689	135,292	69,880	81,621	± 48,870
50,0	40,8	39,754	64,591	40,725	48,357	± 14,068
50,0	35,2	51,707	61,072	60,240	57,673	± 5,184
50,0	33,7	57,793	75,885	72,267	68,648	± 9,573